

Dottorato di Ricerca in
Morfofisiologia E Patologia Veterinaria Con Applicazioni Biotecnologiche

XXV Ciclo

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H2

Settore Scientifico disciplinare: VET 03

Tesi di Dottorato

**Rilievi anatomo-patologici e batteriologici condotti sull'apparato
gastroenterico di una metapopolazione di cinghiali (*Sus scrofa*)**

Dott.ssa Patrizia Bassi

Coordinatore
Prof. Eraldo Seren

Relatore
Dott. Gianfranco Militerno

Correlatore
Prof. Renato Giulio Zanoni

INDICE

INTRODUZIONE	1
1 LAWSONIA INTRACELLULARIS: AGENTE RESPONSABILE DI ENTERITE PROLIFERATIVA	3
1.1 Introduzione e tassonomia	3
1.2 Diffusione e trasmissione	3
1.3 Patogenesi e manifestazioni cliniche	4
1.4 Lesioni anatomo-patologiche	6
1.5 <i>Lawsonia intracellularis</i> nel cinghiale	7
2 CAMPYLOBACTER spp. GASTROENTERICI	10
2.1 Introduzione e tassonomia	10
2.2 <i>Campylobacter</i> spp.: un agente prevalentemente zoonosico	10
2.3 Meccanismi patogenetici	14
2.4 <i>Campylobacter</i> spp. gastrointestinali nel suino domestico e nei suidi selvatici	16
2.5 <i>Campylobacter</i> non - <i>C. jejuni</i> , non – <i>C. coli</i>	18
2.6 <i>Campylobacter</i> nel suino allevato all'aperto e nel cinghiale selvatico	19
3 HELICOBACTER spp. GASTROENTERICI	21
3.1 Introduzione e tassonomia	21
3.2 Meccanismi patogenetici e implicazioni per l'uomo	23
3.3 Ruolo patogeno di <i>Helicobacter</i> spp. nel suino domestico e selvatico	28
4 ANTIBIOTICORESISTENZA: INTRODUZIONE AL MONITORAGGIO NEI SELVATICI	31
4.1 Introduzione	31
4.2 Meccanismi di antibioticoresistenza	32
4.3 Monitoraggio nella fauna selvatica	33
5 IL CINGHIALE: ECOLOGIA E GESTIONE DELLA POPOLAZIONE NELLE AREE PROTETTE	36
5.1 Tassonomia, diffusione e morfologia	36
5.2 Alimentazione	37
5.3 Gestione del cinghiale nelle aree protette	38
5.4 Il Parco Regionale dei Gessi e Calanchi dell'Abbadessa (BO): descrizione del territorio e del piano di controllo per la gestione faunistica e sanitaria del cinghiale selvatico	39

CONTRIBUTO SPERIMENTALE	41
6 STUDIO IMMUNOISTOCHIMICO DELL'INFEZIONE DA <i>LAWSONIA INTRACELLULARIS</i> NEL CINGHIALE SELVATICO	42
6.1 Introduzione	42
6.2 Materiali e metodi	42
6.3 Risultati e discussione	46
7 <i>HELICOBACTER</i> spp.E <i>CAMPYLOBACTER</i> spp. GASTROENTERICI: STUDIO BATTERIOLOGICO E ISTOLOGICO IN UNA METAPOPOLAZIONE DI CINGHIALI	49
7.1 Introduzione	49
7.2 Materiali e metodi	49
7.3 Risultati	63
7.4 Discussione	84
ALLEGATI	89
8 MONITORAGGIO DELL'ANTIBIOTICORESISTENZA DI INDICATORI FECALI IN UNA METAPOPOLAZIONE DI CINGHIALI	104
8.1 Introduzione	104
8.2 Materiali e metodi	105
8.3 Risultati	109
8.4 Discussione	114
ALLEGATI	117
CONCLUSIONI	121
BIBLIOGRAFIA	123

Introduzione

Nell'ambito della patologia gastroenterica del suino sono comprese alcune malattie ad eziologia batterica, sostenute da microrganismi spirillari gram negativi, di cui sono disponibili numerose trattazioni che considerano sia l'aspetto epidemiologico che quello patogenetico.

Per alcuni di questi agenti microbici e per le relative manifestazioni patologiche, poco si conosce, invece, nel cinghiale selvatico, animale strettamente correlato filogeneticamente al suino domestico, ma compreso in un'ecologia completamente differente.

Da queste premesse è nato un approccio di ricerca e studio del comportamento patogeno di alcuni di questi microrganismi nel cinghiale, seppur in una metapopolazione, cercando di rapportare le conoscenze riportate in letteratura sul suino domestico con quanto è scaturito dalle indagini condotte sul cinghiale selvatico.

In particolare, in questa tesi verranno affrontati un patogeno proprio del suino, raramente riscontrato in altre specie animali, ovvero *Lawsonia intracellularis*, agente dell'Enterite Proliferativa (PE), e alcuni microrganismi spirillari come *Campylobacter* spp., e *Helicobacter* spp., che albergano in abbondanza nel suino domestico e vengono correlati, in misura diversa, a lesioni anatomo-patologiche a sede gastroenterica, ma sono noti anche per il loro potenziale zoonosico.

In questa tesi, quindi, vengono riassunti in prima istanza i contenuti emersi dalla letteratura riguardo *Lawsonia intracellularis*, *Campylobacter* spp. ed *Helicobacter* spp., di cui vengono considerati gli aspetti legati alla classificazione tassonomica, ai fattori di patogenicità e al ruolo patogeno che svolgono suino, nonché nell'uomo. In tutti i casi, poi, viene riportato quanto disponibile in letteratura sul cinghiale selvatico, al fine di esporre, nel particolare, le nozioni scaturite dalla disamina della poca bibliografia disponibile.

Successivamente viene riassunto quanto riportato nella bibliografia consultata a proposito di tematiche di antibioticoresistenza e monitoraggio del fenomeno nella fauna selvatica. Questo argomento nasce da alcuni spunti di riflessione, emersi durante lo svolgimento dell'attività sperimentale, che hanno permesso di ampliare lo spettro di studio sulla metapopolazione di cinghiali campionata per orperare un confronto con uno studio condotto negli anni 2002-2004 da Rossi *et al.* (2007) nel medesimo Parco Regionale, ovvero il Parco dei Gessi Bolognesi e Calanchi dell'Abbadessa (BO). Un aspetto del fenomeno di antibioticoresistenza, infatti, all'interno di un più ampio concetto di inquinamento ambientale da farmaci e sicurezza pubblica, viene da poco studiato monitorando i livelli di antibioticoresistenza in indicatori fecali isolati dalla fauna selvatica, cercando di comprenderne meglio quanto e in che modo l'antropizzazione influisca sull'ambiente selvatico e se questo fattore possa rappresentare un rischio per la salute pubblica.

All'interno della trattazione compilativa, infine, si forniscono alcune indicazioni sull'ecologia di questa specie selvatica e specificatamente sulla metapopolazione

campionata inquadrando le caratteristiche del Parco Regionale dei Gessi Bolognesi e Calanchi dell'Abbadessa e del piano di controllo della popolazione in essere nel territorio.

La seconda parte della tesi è suddivisa in tre capitoli relativi ai tre filoni di ricerca affrontati: lo studio degli aspetti anatomo-patologici dell'infezione da *Lawsonia intracellularis* nel cinghiale, l'indagine microbiologica su *Campylobacter* spp. e *Helicobacter* spp. condotta sulla popolazione campionata e relativi quadri anatomo-patologici, e il monitoraggio dell'antibioticoresistenza su alcuni indicatori fecali isolati dai soggetti campionati tramite metodiche standardizzate riconosciute a livello internazionale. Ogni capitolo della parte sperimentale affronta le metodiche utilizzate e i risultati ottenuti, concludendosi con una discussione degli stessi.

Infine, si trovano le conclusioni finali che percorrono le principali considerazioni emerse dai lavori svolti e spunti di riflessione su possibili ricerche future.

Capitolo 1

LAWSONIA INTRACELLULARIS: AGENTE RESPONSABILE DI ENTERITE PROLIFERATIVA (EP)

1.1 Introduzione e tassonomia

Lawsonia intracellularis è un battere Gram negativo, acido resistente, non sporigeno, dotato di un singolo flagello polare, ma mobile solo in ambiente extracellulare e a comportamento intracellulare obbligato, infatti cresce su culture di cellule epiteliali di ileo suino in atmosfera microaerofila.

In base all'analisi del gene 16s rDNA è stato incluso nel *Phylum Proteobacteria*, famiglia *Desulfovibrionaceae*, anche se non possiede attività solfato-riduttiva (McOrist *et al.*, 1995). È un patogeno in misura maggiore il suino, anche se sono stati descritti casi clinici nel cavallo e negli *hamster*.

Nel suino la patologia causata da questo microrganismo ha andamento cronico e prende il nome di Enterite Proliferativa (PE *-proliferative enteropathy*), ma esiste anche una forma acuta emorragica detta PHE (*Proliferative Haemorrhagic Enteropathy*) (Jacobson *et al.*, 2010). Quando isolata da diverse specie animali, *Lawsonia intracellularis* ha mostrato un grado di similarità genica molto elevato e la sua coltivazione, dovuta anche alla caratteristica di essere un battere intracellulare obbligato, è molto difficoltosa e viene realizzata solo in pochi laboratori nel mondo.

La diagnosi può essere fatta in diversi modi, ma l'associazione tra immunoistochimica e identificazione del DNA specifico tramite PCR da tessuto è considerata il *gold standard* (Jacobson *et al.*, 2010). La stessa PCR, se eseguita da materiale fecale, può perdere di sensibilità. Altre tecniche diagnostiche utilizzate sono per la maggior parte sierologiche e vengono impiegate per l'identificazione di aziende infette o per valutare lo stato di sieroconversione, anche se gli anticorpi circolanti sembra possano essere identificati solo per 5 settimane dopo l'infezione (Jensen *et al.*, 2005).

1.2 Diffusione e trasmissione

La patologia causata da *Lawsonia intracellularis* è diffusa in tutto il mondo, in Danimarca, ad esempio, il battere è stato identificato nel 93% delle aziende suinicole, mentre in Svezia nel 48%; sierologicamente sono state identificate come positive il 100% delle aziende in Korea e il 90,9% di 174 aziende testate negli Stati Uniti (Jacobson *et al.*, 2010).

Dati relativi all'anno 2004, raccolti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, indicano, nella regione Lombardia, che 33 allevamenti su 37 esaminati (89%) risultano sierologicamente positivi, con una variabilità di soggetti positivi per azienda da 32 a 90% (Alborali, 2005).

La trasmissione all'interno dell'azienda sembra essere favorita da due fattori: le scarse misure igieniche associate al rimescolamento di animali con differenti età e la presenza delle scrofe che agiscono come vettori subclinici. La sopravvivenza di *Lawsonia intracellularis* nelle feci, infatti, è di 14 giorni se mantenute tra 5 e 15°C, inoltre la dose infettante (10^4 - 10^6 microrganismi) è inferiore alla quantità di battere eliminata con le feci (7×10^8 /g), escrezione che può perdurare anche per 10-12 settimane dopo l'infezione (Jacobson *et al.*, 2010). La presenza delle scrofe infette in forma subclinica può aumentare i rischi di trasmissione, mentre non è ancora ben chiaro il contributo che fornisce la protezione anticorpale materna al suinetto: nonostante siano state riscontrate frequentemente scrofe infette, raramente è stata dimostrata l'eliminazione tramite le feci da suinetti; sembra però che l'infezione precoce possa proteggere l'animale da colonizzazioni successive, anche se non è ben noto per quanto (Jacobson *et al.*, 2010).

La trasmissione tra diverse aziende, invece, è favorita dall'introduzione di nuovi soggetti infetti, per cui l'attuazione di sistemi di quarantena e la possibilità di testare gli animali prima dell'introduzione possono essere pratiche efficaci nel ridurre la trasmissione, anche se non è ancora chiaro quali metodi siano preferibili o quanto siano in grado di evidenziare i soggetti infetti ma subclinici (Jacobson *et al.*, 2010).

Altri fattori che sembrano associati all'infezione da *Lawsonia intracellularis* riguardano l'utilizzo di antibiotici promotori della crescita, poichè sembra che la prevalenza sia ridotta in quei paesi in cui il loro utilizzo è vietato, ma l'associazione potrebbe essere dovuta anche alla necessità delle aziende di queste zone di incrementare le tecniche di prevenzione sanitaria, come l'applicazione del tutto pieno/tutto vuoto, per sostituire in qualche modo la protezione che veniva fornita in precedenza dagli antibiotici stessi (Jacobson *et al.*, 2010).

Infine, tra i fattori che favoriscono o sembrano influenzare l'infezione, troviamo la presenza di normale flora intestinale: suini *germ-free* o suini inoculati con "flora non enterica" sottoposti a infezione da colture pure di *Lawsonia* non hanno mostrato nessuna sensibilità all'infezione, mentre suini *germ-free* infettati con *Lawsonia* e popolazione non definita, contenente flora intestinale suina, hanno sviluppato la malattia, così come nei suini gnotobiotici. Si ritiene, quindi, che la presenza della flora intestinale sarebbe in grado di modificare l'azione patogena di *Lawsonia intracellularis* (Smith & Lawson 2001).

1.3 Patogenesi e manifestazioni cliniche

Nonostante l'interno genoma del battere sia stato sequenziato, non se ne conoscono ancora a fondo i fattori di patogenicità e la loro attività; numerosi studi, però, hanno permesso di mettere in luce il comportamento del patogeno dalle prime fasi di infezione fino alla risoluzione.

Colonizzazione: la colonizzazione del segmento intestinale sembra essere favorita dalla presenza di flagelli mobili monopolari che sono, però, stati osservati solo da *Lawsonia* proveniente da colture cellulari. Una volta penetrate nell'enterocita, infatti, i

microrganismi sembrano perdere questa struttura, la cui presenza non è mai stata osservata nei microrganismi in sede intracellulare (Smith & Lawson, 2001).

Adesione e penetrazione nelle cellule epiteliali: non è ancora ben conosciuto il meccanismo con cui questo battere aderisce e penetra nelle cellule, sembra però che vi siano meccanismi di adesione che prevedono l'interazione ospite – specifica (Smith & Lawson 2001). Una volta raggiunta la membrana cellulare, nel punto di adesione del battere, si forma una depressione accompagnata da ispessimento della membrana stessa che, però, rimane intatta e circonda progressivamente il battere formando un vacuolo che progredisce nel citoplasma (meccanismo di fagocitosi indotta) (McOrist & Gebhart, 2012). La penetrazione è solitaria, ma una volta nel vacuolo i batteri possono replicare e alcuni vacuoli possono fondersi. Per l'ingresso nella cellula sono necessari riarrangiamenti del citoscheletro non ancora del tutto compresi, pare, però, che vi siano meccanismi aggiuntivi a quelli che normalmente coinvolgono il riarrangiamento dell'actina. La rottura del vacuolo avviene precocemente, subito dopo la penetrazione, e già dopo 3 ore i batteri giacciono liberi nel citoplasma (Smith & Lawson, 2001; McOrist & Gebhart, 2012).

Moltiplicazione intracellulare e diffusione: secondo quanto disponibile in letteratura, la proliferazione di *Lawsonia* avviene in concomitanza a quella delle cellule infette: questa peculiarità sembra essere la causa del tropismo di *Lawsonia intracellularis* verso le cellule immature delle cripte (Smith & Lawson, 2001). La proliferazione dell'epitelio infetto aiuta l'infezione in due modi: aumenta il numero delle cellule infette e aiuta il battere a distribuirsi nel tratto enterico. In alcuni *hamster* infettati sperimentalmente è stato calcolato che il grado di divisione cellulare si quadruplica in soli due giorni post-infezione, questo fa sì che le cellule infette si replichino più rapidamente rispetto a cellule non infette, superandole presto in proporzione fino a raggiungere la massima cellularità intorno ai 30-35 giorni dopo l'infezione. Successivamente, la disseminazione del battere avviene principalmente per desquamazione dell'epitelio che favorisce anche l'infezione dei tratti intestinali distali (Smith & Lawson 2001). La localizzazione intracellulare potrebbe rappresentare un vantaggio per il battere, poiché in quella sede il battere può nascondersi al sistema immunitario, inoltre, sembra che *Lawsonia intracellularis* possa influenzare direttamente il meccanismo di elusione del sistema immunitario riducendo l'espressione dei MHC-II (*Major Histocompatibility Complexes class II*) nell'epitelio intestinale normale.

Risoluzione dell'infezione: il processo di ricostituzione del normale epitelio sembra comportare l'eliminazione delle cellule infette delle cripte a cui segue la rigenerazione del normale epitelio. Dopo la perdita delle cellule infette, appunto, le cellule sane proliferano fino a restituire cellule epiteliali ben differenziate e strutture riferibili a villi e cripte strutturalmente normali. Non risulta ancora chiaro il meccanismo che porta all'eliminazione dell'infezione e quindi delle cellule infette. Generalmente nelle infezioni intracellulari un meccanismo che favorisce la *clearance* del battere è proprio l'apoptosi delle cellule infette. Nell'infezione da *Lawsonia*,

invece, l'assenza di apoptosi rappresenta una caratteristica importante e sembra essere mediata dal battere stesso che, in questo modo, si garantirebbe una maggior proliferazione e persistenza all'interno dell'ospite (Smith & Lawson, 2001).

1.3.1 PRESENTAZIONE CLINICA:

Si riconoscono prevalentemente due forme cliniche: quella acuta e quella cronica.

La **forma cronica**, è quella più comune, coinvolge soprattutto suini tra 6 e 20 settimane di età (post-svezzamento) e decorre con bassa mortalità (1-5%), se non sopraggiungono sovrainfezioni. La sintomatologia può essere lieve o assente, le uniche manifestazioni possono riguardare una riduzione delle *performance* di accrescimento. Alcuni suini possono manifestare anoressia associata, comunque, a curiosità verso il cibo e apatia mentre la diarrea, quando presente, si presenta da pastosa ad acquosa, di colore variabile grigio-verdastra. Si evince quindi che, nella maggior parte dei casi, nelle aziende in cui è presente la sola forma cronica, il sospetto di Enterite Proliferativa (PE) sopraggiunge quando si notano ridotti accrescimenti e ridotta capacità di conversione dell'alimento (Jacobson *et al.*, 2010; McOrist & Gebhart, 2012).

La **forma acuta**, detta anche PHE (*Proliferative Haemorrhagic Enteropathy*), si manifesta prevalentemente negli ingrassi e nelle scrofe tra i 4 e i 12 mesi di età e sembra più diffusa nelle aziende che presentano stato sanitario migliore. La mortalità, in questi casi, raggiunge anche il 50% e, se l'infezione avviene nelle femmine gravide, è possibile che si presenti aborto. Clinicamente i reperti più evidenti sono assimilabili ad anemia da emorragia acuta, talora accompagnata da diarrea emorragica o limitata a marcato pallore della carcassa. In alcuni casi sono osservabili febbre e ipotermia (Jacobson *et al.*, 2010; McOrist & Gebhart, 2012).

1.4 Lesioni anatomo-patologiche

Nella **forma cronica** le porzioni enteriche maggiormente coinvolte sono gli ultimi 60 cm del piccolo intestino e il primo terzo del colon prossimale, anche se, nei casi gravi, le lesioni si estendono a digiuno, cieco e porzione distale del grosso intestino. Nelle lesioni più progredite la parete dell'ileo risulta notevolmente ispessita, mentre in quelle minori le lesioni sono confinate ai 10 centimetri terminali dell'ileo, in prossimità dell'ostio ileale (*Ostium ileale*). In questi casi la superficie della mucosa si presenta umida ma non mucoide, talvolta con tracce di essudato infiammatorio intimamente aderente, e aspetto corrugato della superficie. Nei casi in cui le lesioni sono più diffuse, questi aspetti di ispessimento e corrugazione possono essere presenti anche nel grosso intestino, non diffusamente ma a formare placche. Istologicamente la mucosa appare diffusamente ispessita con numerose cripte delimitate da cellule epiteliali immature che formano numerosi strati, fino a 10, e presentano numerose cellule in attiva replicazione (mitosi). Le cellule mucipare solitamente sono assenti, qualora presenti si ritiene che siano indicatori di risoluzione del processo infettivo. *Lawsonia intracellularis* si trova, spesso in numero

considerevole, nella porzione apicale delle cellule epiteliali proliferate e la si può evidenziare con immunoistochimica (IHC), impregnazione argentea, colorazione di Warthin-Starry o al microscopio elettronico. Nelle fasi di risoluzione è possibile osservare alcune cellule epiteliali cariche di batteri nel lume intestinale o nel lume delle cripte e, con colorazione specifica, si possono evidenziare anche nel citoplasma di alcuni macrofagi nella lamina propria che, generalmente, non mostra particolari alterazioni, se non un lieve infiltrato infiammatorio non sempre evidente (McOrist & Gebhart, 2012).

Le alterazioni morfologiche che compaiono nella **forma acuta**, invece, sono caratterizzate da enterite necrotica con elevate quantità di essudato emorragico nel contenuto intestinale. L'intestino in questi casi appare dilatato, ispessito e spesso manifesta edema della sierosa, nel lume, invece, sono contenuti uno o più conglomerati di sangue e materiale necrotico. La superficie mucosa si presenta ispessita e marcatamente iperplastica e, nonostante il contenuto ematico, non si notano soluzioni di continuo della parete intestinale. Istologicamente si rendono ben evidenti le aree di necrosi coagulativa, con fibrina e cellule infiammatorie degenerate, mentre la mucosa rimanente appare emorragica con fenomeni degenerativi dell'epitelio proliferato (McOrist & Gebhart, 2012).

1.5 *Lawsonia intracellularis* nel cinghiale

In ambiente selvatico questo battere è stato dimostrato in alcune specie di cervi in Canada, dove è stato associato alla presenza di enterite (Drolet *et al.*, 1996). Nonostante siano ancora poche le informazioni riguardo la reale prevalenza di questo microrganismo in ambiente selvatico, negli anni si sono succeduti studi il cui intento era quello di valutare, direttamente o indirettamente, la presenza di *Lawsonia intracellularis* e altri comuni patogeni del suino domestico, nel cinghiale, cercando di indagare il possibile ruolo del suide selvatico nel mantenimento e nella diffusione di questo battere. I primi studi in Europa sono stati condotti in Repubblica Ceca, da Tomanová *et al.* (2002) che hanno dimostrato una prevalenza del 45,5% di *Lawsonia intracellularis* utilizzando sia metodi diretti (*nested* PCR su campioni di ileo) sia indiretti (IFAT – *indirect immunofluorescent antibody test*), applicati su un totale di 97 animali. In questo studio, poiché tutti i campioni erano spediti al laboratorio congelati, non è stato possibile svolgere indagini istopatologiche. L'analisi delle sequenze ottenute da questi animali ha permesso d'identificare una percentuale di omologia del 99% con le sequenze di genoma batterico provenienti da suino domestico. Nel particolare, la percentuale di campioni positivi con indagine diretta da tessuto ileale era del 29,6%. Secondo gli autori questo dato era comparabile con la percentuale di suini domestici affetti dalla forma cronica (PE) causata da *Lawsonia intracellularis*, ovvero il 30%. Da questi risultati Tomanová *et al.* (2002) hanno concluso che, data l'elevata prevalenza del patogeno nel cinghiale e dato l'elevato numero di soggetti di cui si compone la popolazione di cinghiali selvatici in

Repubblica Ceca, questa specie potrebbe essere considerata una fonte d'infezione e trasmissione di *Lawsonia intracellularis* anche per altre specie selvatiche.

Qualche anno dopo la prevalenza di *Lawsonia intracellularis* viene indagata anche nella popolazione di cinghiali selvatici svedesi (Jacobson *et al.*, 2005). In questo studio, contrariamente a quanto riscontrato in Repubblica Ceca, nessun campione fecale risulta positivo per questo microrganismo. Questo risultato ha permesso di ipotizzare che la presenza di *Lawsonia intracellularis* nella popolazione di cinghiali svedesi non fosse elevata, anche se questo dato deve esser considerato con precauzione poiché, come asserito dagli stessi autori, il campione esaminato costituiva solo lo 0,4% della popolazione totale.

Più recentemente in Germania, Reiner *et al.* (2011) hanno valutato la prevalenza di *Lawsonia intracellularis* in cinghiali abbattuti in 14 dei 16 *lander* (regioni). Per il loro studio gli autori hanno campionato porzioni di intestino, comprendenti l'ostio ileale, di 165 cinghiali abbattuti nella stagione di caccia 2005-2006 e, tramite PCR, hanno ottenuto una prevalenza totale del 20,6%, senza correlazioni con sesso, età, peso dell'animale o latitudine e longitudine delle zone di caccia. In tutti i soggetti positivi per *Lawsonia intracellularis*, gli autori non hanno identificato lesioni macroscopiche o sintomi legati a enterite proliferativa. Secondo Reiner *et al.* (2011) questo dato può essere spiegato dal basso numero di batteri identificato con PCR quantitativa poiché altri autori (Guedes *et al.*, 2003) hanno trovato una correlazione positiva tra il numero di batteri identificati e la manifestazione di malattia. Inoltre, le differenze nella resistenza agli agenti patogeni e nella virulenza dei microrganismi stessi che intercorrono tra suino e cinghiale selvatico, potrebbero giustificare questi risultati. Rimane, comunque, da considerare che questi animali possano essere serbatoi di *Lawsonia intracellularis*, con possibile ruolo nel mantenimento e diffusione del patogeno anche nell'allevamento di suino tradizionale.

Una situazione intermedia tra il tradizionale suino domestico e il cinghiale selvatico è discussa da alcuni autori che hanno valutato la prevalenza di *Lawsonia intracellularis* e altri comuni patogeni del suino in cinghiali allevati in Finlandia (Hälli *et al.*, 2012). Questo tipo di allevamento sembra essere in espansione in Finlandia, fatto che ha portato allo sviluppo di pratiche intensive che potrebbero favorire la trasmissione di patogeni tra animali e tra allevamenti di cinghiali e allevamenti di suini domestici. Secondo questo studio da 301 campioni esaminati la prevalenza dimostrata con ELISA da siero è stata del 59.2 %. Secondo gli autori l'elevata prevalenza, rispetto a quanto riportato nel cinghiale selvatico, potrebbe essere legata allo stesso allevamento intensivo, quindi alla maggior densità di animali rispetto alla situazione selvatica.

Concludendo, non sono presenti molti dati in bibliografia, inoltre in alcuni casi l'effettiva prevalenza di *Lawsonia intracellularis* sembra differire di molto (da 45,5% a 0% a 20,6%) in base alla nazione di provenienza. In tutti questi studi, però, sono stati indagati dati sierologici o biomolecolari da tessuto. In bibliografia, in un solo caso è stata osservata la presenza diretta dei microrganismi all'interno della mucosa ileale

di cinghiale tramite colorazione di *Warthin-Starry*, un'impregnazione argantica largamente utilizzata nella diagnosi di *Lawsonia intracellularis*, e immunoistochimica (Zlotowski *et al.*, 2008). In questo caso si trattava, però, di cinghiali allevati in un'azienda situata a Rio Grande do Sul, in Brasile, in cui 4 di 56 animali mostranti anoressia, diarrea e dimagrimento, sono stati sottoposti, dopo eutanasia, ad esame necroscopico. Le lesioni osservate in questi animali corrispondevano a quelle che tipicamente si rinvencono nel suino in corso di PE, ovvero linfadenomegalia dei linfonodi meseraici e ispessimento della parete dell'ileo, mentre istologicamente erano evidenti iperplasia delle cripte, lieve riduzione del numero di cellule mucipare, incremento delle figure mitotiche e infiltrato neutrofilico nella mucosa. Nel lume delle cripte, talvolta dilatate, erano inoltre presenti detriti cellulari e granulociti neutrofili, mentre nella porzione apicale degli enterociti che bordavano le stesse cripte, erano ben visibili, con colorazione di *Warthin-Starry*, numerosi microrganismi argentaffini. L'esame immunoistochimico svolto su queste sezioni ha permesso di confermare la diagnosi di enterite proliferativa associata a *Lawsonia intracellularis*. Anche in questi animali, dunque, è possibile osservare la manifestazione patologica di questo agente batterico, anche se, da quanto emerso in letteratura, ciò è stato dimostrato solo in cinghiali allevati in grandi aziende (nel caso di Zlotowski *et al.*, 2008, si parla di un'azienda composta da 1250 capi). Questo dato potrebbe supportare quanto osservato da Hälli *et al.* (2012) sulle prevalenze, ovvero che l'industrializzazione dell'allevamento del cinghiale potrebbe incrementare la prevalenza e la patogenicità di alcuni microrganismi normalmente non patogeni anche perché presenti in basse quantità nel soggetto selvatico.

Capitolo 2

CAMPYLOBACTER spp. GASTROINTESTINALI

2.1 Introduzione e Tassonomia

Il genere *Campylobacter*, compreso nella famiglia *Campylobacteraceae*, è composto microrganismi gram negativi, di forma curva, a “s” o spirillare, mobili grazie a un singolo flagello polare e con dimensioni variabili con larghezza da 0,2 a 0,9 µm e lunghezza da 0,5 a 5 µm. Si tratta di microrganismi non sporigeni, ma possono formare strutture coccoidi qualora si trovino in ambiente sfavorevole o in colture esposte all'aria per lungo periodo (Vandamme *et al.*, 2005). Dal punto di vista metabolico si tratta di batteri microaerofili, raramente in grado di crescere anche in aerobiosi o anaerobiosi ma, per ottenere colture ottimali, si utilizzano generalmente miscele composte da 5% di ossigeno, 10% di anidride carbonica e 85% di azoto (Fitzgerald & Nachamkin, 2011). Il genere comprende 22 specie, di cui le maggiormente conosciute sono *C. jejuni* e *C. coli*, principali responsabili di gastroenterite nell'uomo, nonostante altre specie come *C. concisus*, *C. upsaliensis*, *C. ureolyticus*, *C. hyointestinalis*, *C. sputorum*, considerate ora “emergenti”, siano state associate a disturbi gastrointestinali quali IBD, gastroenterite e periodontite (Fitzgerald & Nachamkin, 2011; Man, 2011). Tutte queste specie colonizzano normalmente diversi apparati degli animali domestici o selvatici (tabella 1) e si possono trovare in numerosi prodotti di origine animale (Man, 2011).

2.2 *Campylobacter* spp.: un agente prevalentemente zoonosico

Secondo L'European Food Safety Authority (EFSA, 2012) i microrganismi del genere *Campylobacter* continuano ad essere i più comuni agenti patogeni zoonotici gastrointestinali riportati dal 2005 in poi in Unione Europea (UE). Solo in un anno, dal 2009 al 2010, le infezioni sono aumentate del 6,7%, mentre nel 2010 le morti accertate sono state 226. I casi confermati in Italia nel 2010 sono stati 457, rapportati ad un numero complessivo in UE di 213.211.

Le principali fonti d'infezione riguardano alimenti di origine animale non correttamente manipolati o cotti, prevalentemente si tratta di prodotti avicoli, ma si annoverano anche latte crudo o non ben cotto, carne di bovino e suino poco cotta, molluschi e di acqua non trattata (Man, 2011).

Le infezioni gastrointestinali causate da *Campylobacter* spp. sono generalmente sporadiche, con incremento dai primi mesi primaverili (marzo) e picco nei mesi estivi, mentre il declino segue il progredire dell'autunno. L'incidenza d'infezione, inoltre, si manifesta con una distribuzione bimodale in base all'età: le maggiori incidenze si trovano nei bambini fino circa a 6 anni e nei giovani/adulti dai 20 ai 40 anni (Fitzgerald & Nachamkin, 2011).

Tabella 1: principali specie di *Campylobacter* e rispettive nicchie ecologiche (modificata da Man *et al.*, 2011)* *Campylobacter* spp. associati a zoonosi con manifestazioni gastroenteriche o extraenteriche.

CAMPYLOBACTER spp.	NICCHIA ECOLOGICA O SEDE D'ISOLAMENTO
<i>C. avium</i>	Pollo e tacchino (contenuto cecale)
<i>C. canadensis</i>	Gru americana (tamponi cloacali)
<i>C. coli</i> *	Bovino (bile, feci, intestino, letame); pollo (fegato, cieco, digiuno, milza, feci); cane (feci); anatra (contenuto cecale); capra (feci, latte); scimmia (feci); suino (feci, ileo terminale, retto); pecora (cistifellea); tacchino, gabbiano
<i>C. concisus</i> *	Gatto (saliva); cane (feci)
<i>C. cuniculorum</i>	Coniglio (contenuto cecale)
<i>C. curvus</i> *	Cane (feci)
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> *	Bovino (feci, feti, sperma, utero, muco vaginale, letame); cavallo (feci), canguro (piccolo intestino); tartarughe " <i>pet</i> " (feci); pecore (feci, feti, encefalo dei feti)
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> *	Bovino (muco vaginale, prepuzio, feti)
<i>C. gracilis</i> *	Cane (feci)
<i>C. helveticus</i> *	Gatto (feci); cane (feci)
<i>C. hyointestinalis</i> * (subsp. <i>Hyointestinalis e lawsonii</i>)	Bovino (feci e composti del letame); cane (feci); <i>hamster</i> (intestino); <i>Cervus timorensis moluccensis</i> (feci, ileo, cieco, colon, linfonodo mesenterico, milza); suino (stomaco, intestino, feci); renna (feci); pecora (feci)
<i>C. jejuni</i> * (subsp. <i>doylei e jejuni</i>)	Bovino (bile, feci, intestino, letame, feti); pollo (feci); cane (feci); anatra (contenuto cecale); capra (latte, feci); pecora (cistifellea); scimmie (feci); elefante marino (retto)
<i>C. lanienae</i>	Bovino (feci); suino (feci); pecora (feci)
<i>C. lari</i> *	Bovino (feci, intestino); pollo (feci); cane (feci, saliva); anatra (feci); puledro e cavallo adulto (feci); pecora (feci); gufo comune (feci); elefante marino (retto); macaco <i>Rhesus</i> , uccelli selvatici
<i>C. mucosalis</i> *	Cane (feci)
<i>C. rectus</i> *	Cane (feci)
<i>C. showae</i> *	Cane (feci)
<i>C. sputorum</i> *	Cane (feci); bovino (feci e sperma); suino (feci); pecora (feci, feti)
<i>C. troglodytis</i>	Scimpanzè (feci)
<i>C. upsaliensis</i> *	Gatto (feci); cane (feci)
<i>C. ureolyticus</i> *	Cavallo (endometrio)

C. jejuni subsp. *jejuni* (comunemente chiamato *C. jejuni*) rimane il principale *Campylobacter* spp. isolato da pazienti sintomatici, secondo numerosi autori, però, la prevalenza di *C. jejuni* e *C. coli* sul totale delle campilobatteriosi intestinali sarebbe dovuta in parte alle metodiche utilizzate durante le pratiche di isolamento. Queste fasi, infatti, prevedono l'utilizzo di condizioni che favoriscono spiccatamente la crescita di *C. jejuni* e *C. coli*, ma non agiscono allo stesso modo su altri *Campylobacter* spp. che richiedono condizioni differenti o tempi di crescita più lunghi. Inoltre, sia la coltivazione che l'identificazione di questi microrganismi a livello di specie non è sempre facile, per cui nella diagnostica di routine spesso non viene eseguita (Man, 2011; Oporto & Hurtado, 2011). In ogni caso *C. jejuni* viene isolato nel 93,4% dei casi di campilobatteriosi sintomatica nell'uomo, se si considerano solo i casi in cui l'identificazione viene fatta a livello di specie, mentre si attesta a 35,7% nel totale dei casi in cui si identifica esclusivamente il genere *Campylobacter*. *C. coli*, invece, viene isolato e identificato nel 2,3% dei casi, mentre il 51,8 % di *Campylobacter* spp. isolati da pazienti con gastroenterite non viene identificato a livello di specie (EFSA, 2012).

Le principali manifestazioni sintomatiche nell'uomo riguardano l'apparato gastroenterico, nonostante siano stati segnalati casi di batteriemia, epatiti, colecistiti, aborto, nefrite, infezioni del tratto urinario e altro ancora (Fitzgerlad & Nachamkin, 2011). Anche se raramente si associa la patologia gastrica alla presenza di *Campylobacter* spp., è stato dimostrato come, in biopsie gastriche prelevate per via endoscopica, alcuni campioni risultati positivi alla colorazione istochimica di Giemsa fossero colonizzati non da *Helicobacter* spp., come normalmente accade, ma da *Campylobacter* spp.. Lo studio, condotto da Seo *et al.*, (2011) analizza 20 biopsie gastriche positive alla colorazione Giemsa ma negative a colorazione immunoistochimica per *Helicobacter pylori* individuando un'infezione da *Campylobacter* spp. in 13 dei 20 casi, da cui vengono poi identificati *C. hyointestinalis* (12/13) e *C. upsaliensis* (1/13). In questi casi la valutazione istologica del campione ha mostrato come la presenza di neutrofili e gli aspetti d'infiammazione cronica fossero ridotti rispetto all'infezione da *H. pylori*, ma comunque superiori a biopsie ottenute da soggetti non infetti (Seo *et al.*, 2011).

Nella manifestazione classica e acuta il tempo d'incubazione è di circa 48-96 ore a seguito di ingestione di un'adeguata dose infettante. La comparsa di sintomi gastroenterici può essere preceduta, nel 50% dei casi, da stati febbrili caratterizzati da temperatura corporea di circa 40°C, malessere generalizzato, mialgia, dolori addominali. Raramente si manifesta vomito, mentre la diarrea, che dura all'incirca 2-3 giorni, può contenere sangue fresco, pus o muco ad indicare un'infezione a sede prevalentemente colon-rettale. Nei campioni fecali analizzati al microscopio si può osservare essudato leucocitario con alcuni microrganismi di aspetto caratteristico *Campylo-like*. L'esame endoscopico in questi casi evidenzia edema ed iperemia della mucosa colica, con o senza emorragie petecchiali.

Le complicazioni immediate alla forma acuta possono essere appendicite, con conseguente peritonite, che si manifesta soprattutto nei giovani, ileite, digiunite e

adenite mesenterica. Nei pazienti con grave immunodepressione l'infezione gastrointestinale può trasformarsi in batteriemia (Butzler, 2004). Esistono, poi, complicazioni croniche che possono avere ripercussioni sia sull'apparato gastroenterico, sia su sistemi extra-intestinali. Alcune delle forme acute intestinali possono evolvere in disturbi funzionali intestinali come IBS (*Irritable Bowel Syndrome*), patologie a carattere infiammatorio, ad esempio IBD (*Inflammatory Bowel Disease*), e morbo celiaco CD (*Celiac Disease*) (Riddle *et al.*, 2012). Inoltre, è stata dimostrata la correlazione tra l'infezione da *Campylobacter jejuni* e l'insorgenza di una sindrome neurologica chiamata *Guillan Barré*, una polineurite caratterizzata da febbre, dolori addominali e debolezza a cui segue paralisi progressiva degli arti (Fitzgerlad & Nachamkin, 2011). Secondo studi sperimentali, più del 36% delle campilobatteriosi acute evolvono in **IBS** nei 2 anni successivi all'infezione. In questi casi si può notare, a livello di mucosa rettale, un aumento dei linfociti intraepiteliali, con incremento dell'infiammazione e iperplasia delle cellule enterocromaffini, il tutto comporta aumento della permeabilità intestinale che, a sua volta, favorisce la penetrazione degli antigeni intraluminali con conseguente ulteriore attivazione del sistema immunitario. Altri disordini funzionali dell'apparato gastroenterico conseguenti a infezioni da *Campylobacter* spp. possono essere: dispepsia funzionale (FD), costipazione funzionale (FC) e reflusso gastro-esofageo; la correlazione tra l'infezione da *Campylobacter* spp. e l'insorgenza di queste sindromi necessita però di ulteriori studi (Riddle *et al.*, 2012). Diversi studi si sono occupati dell'incidenza di **IBD** a seguito d'infezione gastrointestinale acuta e hanno dimostrato un maggiore rischio di sviluppare IBD in soggetti che avevano contratto campilobatteriosi intestinali o salmonellosi. La patogenesi della forma di IBD post-infezione (PI-IBD, *Post-Infectious-IBD*) non è ancora completamente chiara, ma sembra causata da una risposta inadeguata dell'ospite alla flora microbica. L'incremento di permeabilità intestinale, già citato nella patogenesi da IBS, può influenzare anche in questo caso la penetrazione di antigeni microbici dal lume intestinale. A questo fattore si associa un'alterazione nel *pattern* dei recettori che riconoscono gli antigeni intestinali e che sono responsabili del mantenimento dell'omeostasi della flora microbica. Nei pazienti con IBD, infatti, è riconosciuta un'alterazione a carico dei recettori *Toll-Like* e NOD (*Nucleotide Oligomerization Domain*) che potrebbe portare a sovra-regolazione della risposta immunitaria dell'ospite alla flora microbica intestinale, qualora batteri commensali penetrino la barriera intestinale (Riddle *et al.*, 2012). Il medesimo meccanismo di danno intestinale causato da *Campylobacter* spp., con conseguente assorbimento di antigeni dal lume, sembra essere alla base dello sviluppo, in soggetti sensibili, del morbo celiaco. Questo dato è confermato da studi epidemiologici retrospettivi che hanno individuato nell'infezione da *Campylobacter* spp. un fattore di rischio per l'instaurarsi di **CD** in soggetti sensibili, mentre non ne hanno individuato associazioni con altri agenti di gastroenterite infettiva come *Salmonella* spp., *Shigella* spp. o *Yersinia* spp. (Riddle *et al.*, 2012).

Concludendo, le variazioni tra le diverse manifestazioni cliniche possono essere correlate alla diversità genetica che esiste tra diversi isolati di *Campylobacter* spp. sia negli animali che nell'uomo, in aggiunta a fattori come la sensibilità individuale e la protezione immunitaria. Da alcune osservazioni epidemiologiche è emerso che esiste un'immunità protettiva contro lo sviluppo della malattia, che non protegge però dall'infezione stessa. Questo fenomeno risulta evidente, ad esempio, nei lavoratori dei macelli di pollame che mostrano sintomatologia gastroenterica nei primi giorni di lavoro, ma non manifestano più sintomi dopo la prima infezione. Ciò sarebbe dovuto alla persistente esposizione a *C. jejuni* derivante dall'intestino del pollame.

2.3 Meccanismi patogenetici

Il 95% delle campilobatteriosi gastroenteriche dell'uomo è attribuibile a *C. jejuni* e si manifesta con diarrea acuta, spesso contenente sangue e leucociti. Negli animali domestici, invece, entrambe queste specie possono colonizzare l'intestino in gran numero senza apparenti conseguenze per l'ospite, tuttavia talvolta possono provocare la comparsa di feci molli e acquose con muco e tracce di sangue (Joens, 2004).

Numerosi studi asseriscono che, per provocare la malattia, *C. jejuni* debba aderire e penetrare nelle cellule della mucosa di piccolo e grosso intestino. Il legame con le cellule epiteliali permetterebbe al battere di creare un nicchia di protezione contro il transito dell'alimento o la peristalsi (Joens, 2004; Dasti *et al.*, 2010). A seguito del legame, la penetrazione nelle cellule epiteliali avviene per endocitosi mediata dal battere stesso, che opera alterando i segnali di membrana. Dopo una replicazione esponenziale che dura circa 72 h dall'internalizzazione, avviene la traslocazione dei batteri lungo gli strati più profondi di lamina propria e sottomucosa, dove *C. jejuni* viene in contatto con le cellule del sistema immunitario dell'ospite e si può identificarlo microscopicamente all'interno di granulociti e mononucleati (Joens, 2004).

I fattori di virulenza che permettono questo processo patogenetico non sono ancora del tutto noti, ma ne sono stati individuati alcuni quali: la motilità legata alla presenza di flagelli, la capacità di adesione ed invasione della mucosa intestinale e la produzione di alcune tossine (Vandamme *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2011). La capacità di questi batteri di raggiungere il colon, principale organo *target*, sarebbe garantita dalla presenza di flagelli, mentre l'invasione della mucosa intestinale è probabilmente la conseguenza del rilascio di citotossine (Silva *et al.*, 2011).

Per quanto riguarda *C. coli*, il **flagello** si compone di due flagelline (FlaA e FlaB) codificate da due geni chiamati *flaA* e *flaB*. Il gene *flaA* sembra essere essenziale nelle fasi di adesione e invasione della mucosa intestinale, infatti la soppressione di tale gene porta alla formazione di un flagello con mobilità notevolmente ridotta perché composto dalla sola subunità FlaB. Inoltre è ipotizzato che i flagelli posseggano la capacità di secernere proteine non flagellari in grado di influenzare la risposta immunitaria (Silva *et al.*, 2011). *C. coli*, inoltre, possiede geni che codificano proteine

associate alla capacità invasiva del patogeno (*ciaB* e *pldA*) (Man, 2011). *C. jejuni* possiede un flagello polare, anch'esso fondamentale nel processo di adesione alle cellule intestinali, infatti mutanti di *C. jejuni* sperimentalmente privati del flagello, mostrano una marcata riduzione della capacità d'invasione cellulare in colture cellulari in vitro (Dasti *et al.*, 2010). La formazione del flagello, in *C. jejuni*, è regolata da un sistema a due componenti, un sensore FlgS a cui risponde un regolatore FlgR, a cui si aggiungono altre proteine essenziali per la motilità (FlgP e FlgQ), mentre un gene (*CheY*) che codifica per fattori chemiotattici sembra responsabile del moto rotatorio del flagello stesso (Dasti *et al.*, 2010).

Il legame alle cellule epiteliali è stato correlato, per *C. jejuni*, anche alla presenza di altri fattori tra cui la proteina CadF, presente anche in *C. coli*, una proteina di autotrasporto CapA, una di legame periplasmatico (PEB1) e una lipoproteina di superficie (JlpA). La CadF media l'attività di adesione alla superficie cellulare tramite il legame con la fibronectina, una proteina della matrice cellulare, inoltre sembra innescare la cascata di segnali che permette la propria internalizzazione. Il gene *cadF*, che codifica per la proteina omonima, differisce in *C. coli* per un'inserzione di 39-bp, che porta ad una marcata riduzione nella capacità di invasione cellulare rispetto a *C. jejuni* (Dasti *et al.*, 2010).

Altro importante fattore di virulenza di *Campylobacter* spp. è la capacità di produrre una tossina denominata **Cytolethal Distending toxin (CDT)**, prodotta da numerosi batteri gram-negativi (es: *Haemophilus parasuis* e batteri dei generi *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Salmonella*, *Shigella*) e prima tossina batterica scoperta in grado di dare arresto del ciclo cellulare nelle cellule di mammiferi. La CDT si compone di tre subunità, codificate rispettivamente da tre differenti geni: *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* ed è in grado di arrestare il ciclo cellulare nella fase G₂/M, inibendo la mitosi e provocando la morte cellulare. La subunità attiva della tossina è la *cdtB*, mentre non sono ancora ben noti i ruoli delle subunità *cdtA* e *cdtC*. Si ipotizza che queste siano comunque fondamentali per la penetrazione della subunità attiva all'interno delle cellule epiteliali della mucosa intestinale. In questo modo la *cdtB* può penetrare nella cellula e venir trasportata, attraverso l'apparato di Golgi, al reticolo endoplasmatico da cui raggiunge il nucleo tramite un meccanismo di trasporto retrogrado. Una volta penetrata nel nucleo, la *cdtB*, può bloccare l'attività della CDC2 chinasi, che permette l'entrata in mitosi tra le fasi G₂ ed M del ciclo cellulare, bloccando il ciclo stesso. È stato dimostrato, inoltre, che la CDT è responsabile nell'uomo della produzione di interleuchina (IL-) 8 con conseguente richiamo di macrofagi, cellule dendritiche e granulociti neutrofili nel sito di invasione, inducendo flogosi a livello intestinale (Dasti *et al.*, 2010). Questa tossina è presente sia in *C. jejuni* che *C. coli*, ma anche in altri *Campylobacter* spp. come *C. foetus*, subsp. *foetus* e subsp. *venerealis*, *C. hyointestinalis*, *C. lari* e *C. uspaliensis*. (Dasti *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; Man, 2011). Altre tossine prodotte da questi batteri possono essere emolisine, come nel caso di *C. coli* o enterotossine, come per *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* (Man, 2011). Sebbene dai dati si possa ipotizzare la partecipazione di questa tossina nel processo

patogenetico intestinale, somministrazioni intragastriche di questa tossina, anche in dosi massicce, su ospiti maturi ed immaturi, immunocompetenti o immunodepressi, non sono esitate nella manifestazione gastrointestinale classica conseguente all'infezione con questi batteri; rimane quindi da chiarire se e in che modo questa tossina possa contribuire al danno alla barriera intestinale (Jinadasa *et al.*, 2011).

La resistenza di questi microrganismi all'interno dell'ospite e nell'ambiente, sembra essere legata anche alla loro capacità di unirsi in aggregati incapsulati all'interno di una sostanza polimerica extracellulare che rimane adesa a diverse superfici. La formazione di questo **biofilm** è stata descritta per *C. jejuni* su tessuto umano di origine ileale, ma la possibilità di creare lo stesso *biofilm* su superfici quali vetro, acciaio inossidabile o polystyrene è descritta, oltre che per *C. jejuni*, anche per *C. coli*, *C. hyointestinalis* e numerosi altri *Campylobacter* spp. emergenti (Man, 2011). Ancora non è noto l'esatto ruolo di questo *biofilm* nella patogenesi delle infezioni dovute a *Campylobacter* spp., si ipotizza, però, che possa anche facilitare la colonizzazione della cavità orale favorendo la comparsa di periodontiti (Man, 2011).

2.4 *Campylobacter* spp. gastrointestinali nel suino domestico

Il suino può ospitare diverse specie di *Campylobacter* spp. che non sono, però, associati a sindromi enteriche caratteristiche. Le manifestazioni gastrointestinali conseguenti a colonizzazione da *Campylobacter* spp. (generalmente *C. jejuni* e *C. coli*) riguardano in gran parte suinetti privati di colostro, poiché l'immunità materna in genere protegge dallo sviluppo della malattia, anche se non inibisce la colonizzazione del tratto gastro-intestinale, prevalentemente a livello di ileo e grosso intestino. Una volta moltiplicati a livello ileale, questi microrganismi si portano a livello di grosso intestino, dove si trovano strettamente associati alla mucosa senza, però, penetrarla (Taylor, 2012).

Nei casi in cui *Campylobacter* spp. provoca sintomatologia gastroenterica, si possono avere manifestazioni diverse a seconda delle età dei soggetti considerati. Nei suinetti, oltre ad un incremento moderato di temperatura (circa 40°C), si può osservare diarrea acquosa o cremosa, contenente muco e, occasionalmente, tracce di sangue (Taylor, 2012). Nei suini in svezzamento, invece, l'infezione da *C. coli* provoca diarrea cronica contenente muco in cui generalmente non si trovano tracce di sangue. In entrambi i casi, comunque, l'infezione è accompagnata da perdita di peso corporeo e decadimento delle condizioni corporee generali, raramente però si osserva mortalità (Taylor, 2012). In questi casi le lesioni macroscopiche a livello enterico rimangono modeste e confinate al piccolo intestino, con lieve infiammazione accompagnata da contenuto mucoide nel cieco per quanto riguarda i suinetti sotto scrofa, mentre per i soggetti in svezzamento si può osservare marcato ispessimento della parete intestinale nella porzione terminale del piccolo e nel grosso intestino. Anche nelle sezioni istologiche le lesioni sono moderate, con lieve accorciamento e fusione dei villi e iperplasia marcata del tessuto linfoide dell'ileo, talora

accompagnata da microascessi nelle cripte ileali nei suini in svezzamento (Taylor, 2012).

Nel complesso delle possibili infezioni gastrointestinali del suino, il sospetto di campilobatteriosi può essere avanzato quando, oltre alle lesioni macro e microscopiche, si possono isolare elevate quantità di microrganismo dal contenuto intestinale o dalle feci dei soggetti infetti, ma la sensibilità dei suinetti, unita alla similitudine tra la fisiologia gastrointestinale del suino e quella umana, hanno fatto dei suinetti il modello animale più usato per studiare le campilobatteriosi intestinali (Murphy *et al.*, 2011; Taylor, 2012). Studi sperimentali hanno comparato le risposte a infezione da *Campylobacter* spp. su linee cellulari umane e di suino e hanno dimostrato come l'epitelio intestinale suino risponda in maniera molto simile a quello umano in corso di infezione da *Campylobacter jejuni* e *C. coli*, in particolare riguardo i meccanismi di invasione batterica, risposta immunitaria innata e la funzione di barriera dell'epitelio stesso, che risulta ridotta in entrambe le tipologie cellulari (Murphy *et al.*, 2011).

La variabilità delle manifestazioni in corso di infezione da *C. jejuni* non è legata solo alla diversa virulenza dei ceppi batterici o allo stato immunitario dell'ospite. Studi condotti su suinetti gnotobiotici hanno dimostrato, infatti, che esiste una sinergia tra *Campylobacter jejuni* e un nematode, *Trichuris suis*, ovvero che la presenza contemporanea dei due agenti provoca sintomatologia e lesioni più gravi di quelle riscontrate nelle singole infezioni. (Mansfield *et al.*, 2003). Non è ancora ben noto il principio alla base di questa sinergia, secondo alcune ipotesi potrebbero esserci due meccanismi: uno di danno fisico alla barriera epiteliale, che favorirebbe l'adesione batterica sulla membrana basale esposta e un secondo mediato da citochine. La risposta all'infezione da *Trichuris suis*, infatti, coinvolge maggiormente i linfociti TH-2 che, apparentemente, favoriscono l'invasione da parte di *Campylobacter jejuni* (Mansfield *et al.*, 2003). Nei suinetti co-infetti la sintomatologia era molto simile a quella riscontrata in pazienti umani e nei primati, con diarrea sanguinolenta contenente muco con leucociti. Macroscopicamente erano visibili emorragia, iperplasia delle cripte e ispessimento degli strati sottomucoso e muscolare del colon prossimale, con aumento notevole delle dimensioni dei complessi linfoghiandolari della sottomucosa. In questi casi la valutazione istologica delle lesioni intestinali ha evidenziato maggior infiltrato infiammatorio misto, composto da linfociti, macrofagi, granulociti neutrofili, plasmacellule, e granulociti eosinofili nella mucosa e nella sottomucosa sia del colon prossimale che di quello distale, rispetto alle singole infezioni dove, peraltro, non erano quasi mai compresenti tutti questi tipi cellulari (Mansfield *et al.*, 2003).

Tuttavia, anche se *C. jejuni* rimane il maggior responsabile di zoonosi alimentari nell'uomo, questo battere è meno presente nella specie suina rispetto a *C. coli* (von Altrock *et al.*, 2012). *C. coli* si riscontra frequentemente nell'intestino di suino e, sebbene la sua presenza sulle carcasse sia irrisoria, è stato isolato da frattaglie al momento della vendita, come fegato, cuore, trippa e reni (Little *et al.*, 2008). I ceppi

isolati dal suino sono spesso resistenti a eritromicina e tetracicline, inoltre la capacità di questo microrganismo di resistere, in misura maggiore rispetto a *C. jejuni*, all'attività di numerosi antibiotici, tra cui anche macrolidi e fluorochinoloni, ne ha incrementato l'interesse scientifico poiché questi sono i farmaci generalmente utilizzati in medicina veterinaria nelle infezioni sistemiche causate da *Campylobacter* spp., soprattutto in soggetti immunodepressi (von Altrock *et al.*, 2012).

2.5 *Campylobacter* spp. non-*C. jejuni*, non-*C. coli*

Il suino è la nicchia ecologica di altri *Campylobacter* spp. come *C. hyointestinalis*, nelle due sottospecie *hyointestinalis* e *lawsonii*, *C. lanienae* e *C. sputorum*, il cui potenziale zoonosico è stato provato o ipotizzato (Man, 2011).

Per quanto riguarda *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* questo è stato più volte associato a gastroenterite umana, inoltre ne è stata dimostrata anche la trasmissione in un caso clinico che coinvolgeva una donna affetta da gastroenterite per un periodo superiore ad un mese e che viveva e lavorava in una fattoria in cui erano presenti suini, polli, gatti e cani. In questo caso, dopo isolamento di *C. hyointestinalis* da feci dei suini della fattoria, la correlazione epidemiologica è stata dimostrata tramite *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) con la quale gli isolati dal suino e dalla paziente sono risultati geneticamente identici (Gorkiewicz *et al.*, 2002). Al contrario, per *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* non è mai stato dimostrato il potenziale zoonosico, nonostante sia stato isolato anche da feci umane e sia stato identificato nello stomaco di pazienti affetti da gastroenterite in compresenza con *C. jejuni* (On *et al.*, 1995).

Campylobacter hyointestinalis subsp. *lawsonii* è stato identificato per la prima volta in campioni di mucosa gastrica e intestino di suino, ma anche in *hamster*, bovini e cervi, inoltre mostra elevata omologia genetica (97.2-97.7 % di similarità nella sequenza del gene 16S rRNA) con un'altra specie di *Campylobacter*, anch'essa presente sia in suini che bovini e uomo: *C. lanienae* (Sasaki *et al.*, 2003). Quest'ultimo è stato isolato per la prima volta da personale asintomatico addetto alla macellazione durante un progetto di *screening* igienico in Svizzera: nei soggetti positivi a questa specie l'unico fattore in comune era il tipo di lavoro svolto che li esponeva al contatto con carcasse bovine e suine (Logan *et al.*, 2000). Successivamente questo microrganismo è stato isolato, non senza difficoltà, da campioni fecali di suino, dove sembra comportarsi da normale commensale, e feci bovine. Nel bovino è stata confermata una correlazione tra la presenza di *C. lanienae* e la gravità di ascessi epatici, dato che ha permesso di ipotizzare un ruolo patogeno di questo battere per la specie bovina (Inglis *et al.*, 2004). In uno studio condotto in Ungheria nel 2011 da Schweitzer *et al.*, *C. lanienae* è risultato essere il secondo (20,7%, contro 75% di *C. coli* e 5,3% di *C. jejuni*) più frequente *Campylobacter* isolato da contenuto intestinale di 480 suini macellati. Sebbene il potenziale zoonosico non sia ancora stato confermato, il ritrovamento di questo battere in campioni provenienti da lavoratori addetti alla macellazione e la sua elevata presenza nei campioni intestinali esaminati, permettono di annoverarlo tra i potenziali agenti di zoonosi; inoltre la sua significante (60,9%)

resistenza alla tetraciclina e la presenza di forme multiresistenti, nonché la frequente compresenza di altri *Campylobacter* spp. nei campioni esaminati, pone questioni sul suo ruolo nella trasmissione della resistenza agli antimicrobici (Schweitzer *et al.*, 2011). Inoltre, come sopra menzionato, *C. lanienae* è stato recentemente isolato anche da suini selvatici in America, dove risultava secondo in frequenza dopo *C. jejuni* (Jay-Russel *et al.*, 2012).

Sebbene isolato anche dalle feci di suino, *C. sputorum* si ritrova meno di frequente in questa specie. Nell'uomo è stato isolato in pazienti affetti da gastroenterite, ma non si considera come significativamente patogeno per l'uomo (Man, 2011; Logan *et al.*, 2000).

Sia per *Campylobacter hyointestinalis* che per *C. coli* sono stati identificati i geni codificanti per CDT, anche se la produzione della forma attiva della tossina non è mai stata dimostrata (Jinadasa *et al.*, 2011).

2.6 *Campylobacter* spp. nel suino allevato all'aperto e nel cinghiale selvatico

Se si considera l'**allevamento suino condotto all'aperto** la contaminazione dell'ambiente esterno da parte della fauna selvatica provocherebbe, secondo alcuni autori, un incremento nella prevalenza di *C. jejuni* rispetto a *C. coli* nei suini stessi, inoltre la contaminazione da *C. jejuni* avverrebbe in animali più giovani (Alter *et al.*, 2005). Studi condotti in Danimarca da Jensen *et al.* (2006) indicano invece che, sebbene la prevalenza di *C. jejuni* in suini allevati all'aperto sia maggiore rispetto all'allevamento convenzionale, *C. coli* rimane il più rappresentato in questa specie animale. Secondo i loro studi, inoltre, l'ambiente dell'allevamento esterno sarebbe più contaminato da *C. jejuni* rispetto all'allevamento tradizionale (35% contro 0,7% di campioni positivi), dato che ha permesso d'ipotizzare che la contaminazione sia più persistente anche per le difficoltà maggiori che si riscontrano nella pulizia dei *paddocks* all'aperto. La maggior prevalenza di *C. jejuni* riscontrata nei loro studi (28,9% contro 2,3% e 1,3% degli allevamenti convenzionali) non sembra comunque sufficiente a confermare che la fauna selvatica sia responsabile di maggiori contaminazioni in questi allevamenti. La sierotipizzazione con *Pulsed-Field Gel Elettroforesis* (PFGE) condotta sui ceppi isolati, infatti, non ha mostrato corrispondenze significative tra i ceppi isolati dai suini allevati all'aperto rispetto a quelli isolati dall'ambiente circostante e da altre fonti (ad esempio la fauna selvatica) indicando perciò che la fonte principale di contaminazione da *Campylobacter jejuni* e *C. coli* nella allevamento suino rimane il suino stesso (Jensen *et al.*, 2006). Al contrario, altri studi condotti in Iowa da Sippy *et al.* (2012) hanno evidenziato che alcuni isolati di *C. jejuni* ottenuti da uccelli selvatici (*Zonotrichia albicollis* – passero gola bianca) erano geneticamente identici a cloni isolati in corso di aborti in allevamenti di pecore, suggerendo così l'importanza degli animali selvatici, soprattutto volatili, come fonte di infezione da *Campylobacter* spp. per gli animali domestici. Inoltre, gli isolati in questione risultavano essere resistenti alle tetracicline,

esattamente come quelli ottenuti dai casi di aborto prima menzionati. Secondo Sippy *et al.* (2012) quindi, il possibile ruolo di *reservoir* di *Campylobacter* spp. patogeni e/o antibiotico-resistenti rivestito dalla fauna selvatica potrebbe avere importanti implicazioni sia nella trasmissione degli stessi alla fauna domestica, sia per la salute pubblica.

Poco si conosce sulla diffusione di questo microrganismo nel **cinghiale selvatico**. I suini selvatici e i cinghiali possono essere fonti di trasmissione di *Campylobacter* spp. sia agli animali domestici che all'uomo, direttamente tramite l'ingestione o la manipolazione di prodotti ottenuti da questi animali, sia indirettamente tramite la contaminazione delle colture o delle acque per irrigazione (Jay-Russel *et al.*, 2012). In uno studio recentemente condotto da Jay-Russel *et al.* (2012) negli Stati Uniti, da prelievi su suini selvatici (ovvero suini domestici divenuti selvatici e incrociati con cinghiali europei, chiamati "*feral swine*") è risultata una prevalenza di *Campylobacter* spp. nel 40% nei soggetti campionati, in cui sono risultati maggiormente rappresentate le specie *C. jejuni* e *C. lanienae*, nonostante quest'ultima in bibliografia fosse presente in misura maggiore nel bovino. In questo studio, inoltre, i soggetti positivi albergavano frequentemente più di una sola specie di *Campylobacter*, tra cui *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. sputorum*, *C. coli* e *C. fetus* e risultavano maggiormente coinvolti i soggetti giovani.

In Europa sono state condotte ricerche sui cinghiali in Svizzera (Wacheck *et al.*, 2010) e Svezia (Wahlström *et al.*, 2003). Nel primo caso a fronte di un campionamento ampio per lo studio di batteri responsabili di malattie trasmesse con gli alimenti, non sono stati trovati soggetti positivi per *Campylobacter* spp. tramite metodi di *screening* in kit (VIDAS®*Automated enzyme-linked fluorescent immunoassay*). In Svezia, invece, *C. jejuni* e *C. coli* sono stati isolati da campioni fecali del 12% dei cinghiali campionati. In questo caso *C. coli* è stato isolato con più frequenza rispetto a *C. jejuni*, ma in due campioni positivi per genere *Campylobacter* non è stata indagata la specie.

Capitolo 3

HELICOBACTER spp. GASTROINTESTINALI

3.1 Introduzione e tassonomia

Il genere *Helicobacter* comprende batteri gram negativi, non sporigeni e mobili, infatti possiedono flagelli singoli o multipli. Morfologicamente questi batteri si distinguono per la caratteristica forma elicoidale, ma possono essere anche fusati o curvi, con dimensioni variabili da 0,3 a 0,6 μm in larghezza e da 1 a 10 μm in lunghezza, inoltre, come *Campylobacter* spp., possono assumere forma sferoidale o coccoide se si trovano in vecchie colture o se vengono coltivati in ambiente non ottimale (On *et al.*, 2005; Lawson, 2011). I flagelli, in numero diverso a seconda della specie, possiedono una guaina nella maggior parte delle specie studiate, ma alcuni, come *H. pullorum* e *H. canadensis*, possiedono flagelli “unshated”, ovvero privi di tale rivestimento, formando, insieme ad altre 5 specie, un gruppo filogenetico distinto all'interno del genere. La coltivazione di questi batteri non è semplice, crescono lentamente e richiedono atmosfera umida con livelli di ossigeno bassi (5-10%) e alta percentuale di anidride carbonica (5-12%), a temperatura di circa 37°C. Le caratteristiche enzimatiche, quali l'idrolisi dell'urea, la riduzione dei nitrati, l'idrolisi dell'indoxyl-acetato, l'attività della fosfatasi alcalina e altre, variano nelle diverse specie, per questo i *pattern* di espressione dell'attività enzimatica sono utilizzati nell'identificazione delle specie (On & Holmes, 1991a; Lawson, 2011).

Il genere *Helicobacter* è compreso nella famiglia “*Helicobacteriaceae*”, insieme al genere *Wolinella*; entrambi fenotipicamente simili al genere *Campylobacter* (On *et al.*, 2005; Lawson, 2011). Dalla sua costituzione nel 1989, questo genere è cresciuto fino a comprendere 32 specie, incluse due specie ancora non formalmente riconosciute (Figura 1). Basandosi sull'analisi della sequenza del gene 16s rRNA, all'interno del genere *Helicobacter* si possono riconoscere distintamente due gruppi: il primo comprende *Helicobacter* spp. gastrici, generalmente residenti nello stomaco, il secondo quelli chiamati “enteroepatici”, risiedenti nell'intestino, nel fegato o nelle vie biliari, come indicato in tabella 2 (Lawson, 2011). In aggiunta a questi esistono alcuni *Helicobacter* spp. la cui classificazione è ancora in divenire. Questi possiedono forma allungata fusata e sono circondati da fibrille periplasmiche, oltre a essere dotati di ciuffi di flagelli ad entrambe le estremità: si tratta delle “*flexispire*”, originariamente riferite a *Flexispira rappini*, oggi distinte filogeneticamente in 10 *taxa*, di cui il 2, 3 e 8 costituiscono un'unica specie, *Helicobacter bilis*, mentre i *taxa* 1, 4 e 5 sono assimilabili alla specie *H. trogontum*. Microrganismi del genere *Helicobacter* sono stati isolati da un'ampia varietà di ospiti mammiferi, inclusi uomo, animali domestici come cane e gatto, animali da produzione (bovini, pecore, conigli e suini) e roditori, ma anche in uccelli domestici e selvatici, nonostante ciò i meccanismi di trasmissione non sono ancora del tutto noti (Lawson, 2011).

Tabella 2: rappresentazione delle diverse specie di *Helicobacter*, indicando la sede primaria di localizzazione e l'ospite di riferimento (Lawson, 2011).

	SPECIE	OSPITE PRIMARIO	LOCALIZZAZIONE
<i>Helicobacter</i> gastrici	<i>H. acinonychis</i>	Ghepardo	Stomaco
	<i>H. baculiformis</i>	Gatto	Stomaco
	<i>H. bizzozeronii</i>	Cane, gatto	Stomaco
	<i>Candidatus H. bovis</i>	Bovino	Stomaco
	<i>H. ceto rum</i>	Delfino, balena	Stomaco
	<i>H. crynogastricus</i>	Cane	Stomaco
	<i>H. felis</i>	Cane, gatto	Stomaco
	<i>Candidatus H. heilmannii</i>	Uomo	Stomaco
	<i>H. pylori</i>	Uomo	Stomaco
	<i>H. salomonis</i>	Cane	Stomaco
	<i>H. suis</i>	Suino	Stomaco
<i>Helicobacter</i> enteropatici	<i>H. anseris</i>	Oca	Intestino
	<i>H. aurati</i>	Roditori (<i>hamster</i>)	Intestino
	<i>H. bilis</i>	Roditori, cane	Intestino, fegato
	<i>H. brantae</i>	Oca	Intestino
	<i>H. canis</i>	Cane	Intestino
	<i>H. choecystus</i>	Roditori (<i>hamster</i>)	Fegato
	<i>H. cinaedi</i>	Roditori, cane, primati	Intestino
	<i>H. equorum</i>	Cavallo	Intestino
	<i>H. fennelliae</i>	Cane	Intestino
	<i>H. hepaticus</i>	Roditori	Intestino, fegato
	<i>H. marmotae</i>	Roditori (marmotte), gatto	Intestino, fegato
	<i>H. mastomyrinus</i>	Roditori (<i>mastomys</i>)	Intestino, fegato
	<i>H. muridarum</i>	Roditori	Intestino
	<i>H. mustelae</i>	Furetto	Stomaco
	<i>H. pametensis</i>	Uccelli (sterna), suino	Intestino
	<i>H. trogonum</i>	Roditori	Intestino
<i>Unshated</i>	<i>H. typhlonius</i>	Roditori	Intestino
	<i>H. canadensis</i>	Pollo, oca	Intestino
	<i>H. ganmani</i>	Roditori (topi)	Intestino
	<i>H. mesocricetorum</i>	Roditori (<i>hamster</i>)	Intestino
	<i>H. pullorum</i>	Polli	Intestino
	<i>H. rodentium</i>	Roditori	Intestino
	<i>H. "winghamensis"</i>	Roditori	Intestino

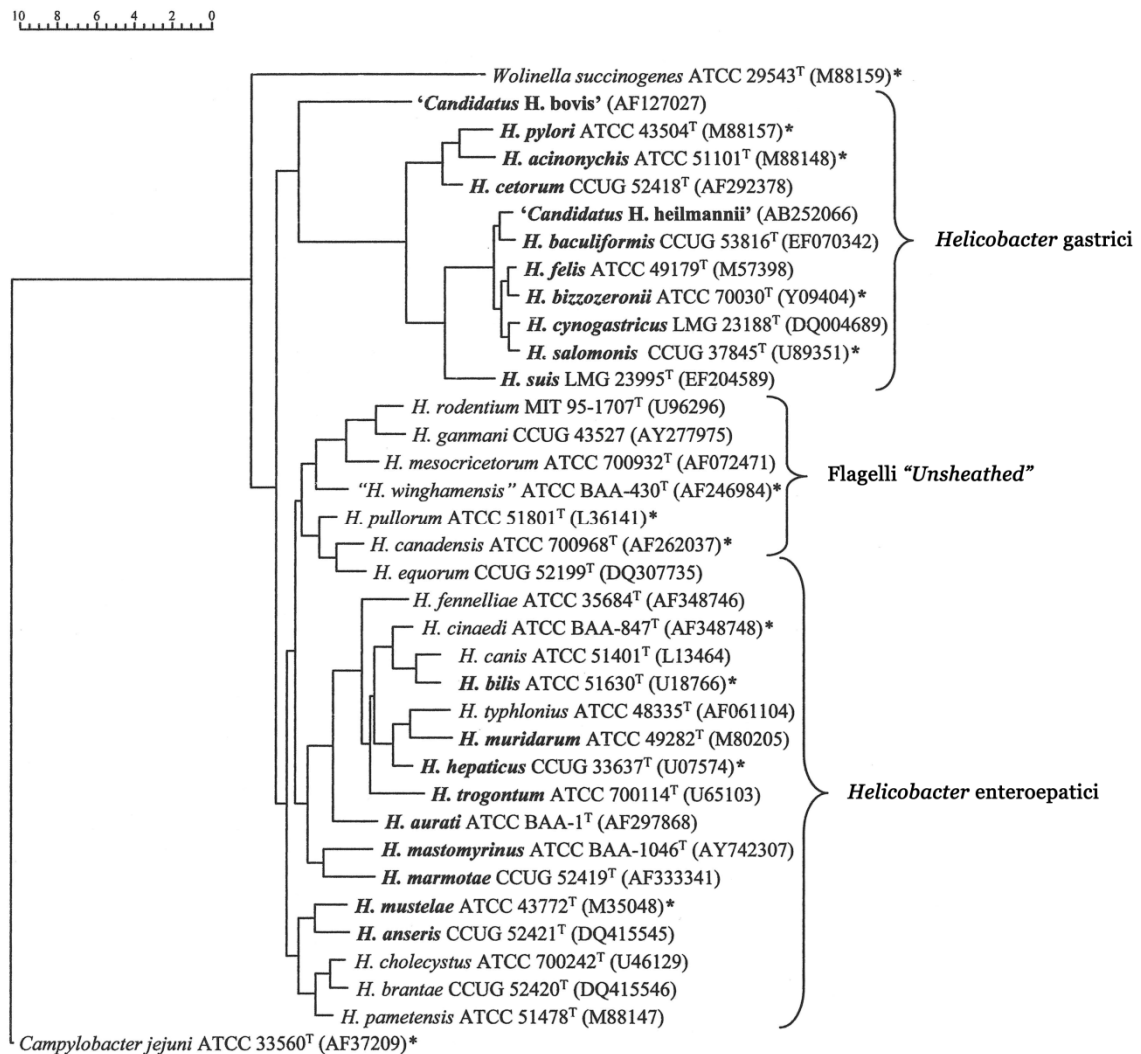


Figura 1: albero filogenetico del genere *Helicobacter* costruito con metodo *neighbor-joining* in base a sequenze del gene 16s rRNA. La barra rappresenta la percentuale di divergenza. Le specie evidenziate in grassetto sono ureasi positive, le altre, invece, sono ureasi negative (Lawson, 2011).

3.2 Meccanismi patogenetici e implicazioni per l'uomo

Come già menzionato i microrganismi del genere *Helicobacter* si dividono essenzialmente in due gruppi: gastrici e enteroepatici. Tra i due gruppi esistono differenze anche nell'espressione dei meccanismi di patogenicità, per cui verranno trattati in prima istanza quelli gastrici e in seguito quelli enteroepatici.

3.2.1 *HELICOBACTER* SPP. GASTRICI

Tra gli *Helicobacter* spp. gastrici il più conosciuto è senz'altro *H. pylori*, responsabile di una varietà di manifestazioni patologiche gastriche nell'uomo. I suoi fattori di virulenza sono sicuramente quelli più studiati e di cui si trovano abbondanti riferimenti in bibliografia. Brevemente si possono distinguere fattori di adesione alla

mucosa gastrica e di persistenza in ambiente acido, lipopolisaccaridi e proteine come la CagA e la VacA.

I meccanismi di adesione all'epitelio gastrico sono mediati da **adesine** come la BabA, in grado di legarsi ad antigeni cellulari superficiali del gruppo sanguigno, la SabA che sembra in grado di legarsi anche alla laminina, una proteina della matrice extracellulare, e la OipA che, sebbene identificata primitivamente come proteina pro-infiammatoria, sembra invece favorire l'adesione cellulare (Kusters *et al.*, 2006).

I **lipopolisaccaridi** (LPS) espressi da *H. pylori* contengono antigeni strutturalmente e immunologicamente molto simili a quelli dei gruppi sanguigni umani. Questi antigeni, chiamati antigeni di Lewis, presentano elevata plasticità in grado di favorire l'evasione dalle difese dell'ospite e la colonizzazione, inoltre la loro espressione aumenta l'internalizzazione del battere da parte delle cellule epiteliali (Kusters *et al.*, 2006).

L'infezione da *Helicobacter pylori* è caratterizzata, in molti casi, da cronicizzazione, per cui la **resistenza** del battere **in ambiente acido** è sicuramente un punto cruciale nel processo patogenetico. Questo battere, infatti, non è acidofilo, per cui deve proteggersi dal pH gastrico e riuscire a moltiplicarsi a pH che, nell'uomo, variano tra 4 e 6,5. Inizialmente si ipotizzava che, una volta raggiunto lo stomaco, *H. pylori* si muovesse rapidamente, tramite i flagelli, attraverso lo strato mucoso che sovrasta l'epitelio, orientandosi grazie al gradiente creato da urea e bicarbonati nel lume gastrico. Recentemente, invece, è stato dimostrato che un'alterazione del gradiente di queste sostanze non influisce sull'orientamento spaziale di *H. pylori* in fase di colonizzazione, mentre manipolazioni a carico del pH ambientale sono in grado di influire sull'orientamento spaziale di *H. pylori*. Il comportamento di *H. pylori* nei confronti del pH è stato dimostrato osservando l'attività del battere in un ambiente a gradiente di pH: in risposta all'acido cloridrico *H. pylori* è in grado di allontanarsi dalla fonte acida e, per farlo, utilizza recettori chemotattici chiamati TlpB e flagelli mobili (Haesebrouck *et al.*, 2009). Inoltre, una volta allontanatosi dall'ambiente acido, la motilità di *H. pylori* decresce fino a cessare; questa capacità di cessare il movimento una volta lontano da un ambiente dannoso potrebbe favorire l'azione dei meccanismi di adesione (Haesebrouck *et al.*, 2009). Il maggior fattore di resistenza all'ambiente acido è rappresentato dall'enzima **ureasi**, composto da due subunità chiamate UreA e UreB, la cui attività è presente in tutti gli *H. pylori* finora isolati e consiste nella produzione di ammoniaca e bicarbonati a partire dall'urea. L'ammoniaca prodotta incrementa i livelli di pH, inoltre possiede effetto citotossico sulle cellule epiteliali gastriche, favorendo il rilascio di nutrienti per il battere e mantenendo il processo infiammatorio, mentre il bicarbonato sembra sopprimere l'effetto battericida di un metabolita dell'ossido nitrico (Kusters *et al.*, 2006). La sola produzione di urea da fonti intrinseche all'ambiente gastrico non è, però, sufficiente a garantire l'alcalinizzazione necessaria alla sopravvivenza. Questo battere è dotato anche di una pompa protonica chiamata UreI che regola l'ammontare di urea che può penetrare nel citoplasma. Quando questa pompa è attivata dal pH acido ambientale l'ureasi si

muove dalle porzioni interne a quelle esterne di *H. pylori*, vicino alle riserve di urea (Haesebrouck *et al.*, 2009).

Come già anticipato, uno dei fattori che garantisce la sopravvivenza del battere prima della colonizzazione è la motilità, assicurata dalla presenza di **flagelli** monopolari formati da un corpo, un uncino e un filamento. Il filamento si compone di due subunità, FlaA e FlaB e funziona come un'elica; il flagello è ricoperto da una guaina che sembra fornire protezione dall'ambiente acido e mascherare gli antigeni. Il corpo del flagello è compreso nella parete della cellula batterica e contiene le proteine che garantiscono la rotazione e la chemiotassi. L'uncino, infine, assicura il filamento al corpo batterico (Haesebrouck *et al.*, 2009).

I fattori maggiormente studiati nella patogenesi di *Helicobacter pylori* sono due proteine chiamate CagA e VacA. La proteina **CagA** (*citotoxin-associated gene A*), sintetizzata dal gene omonimo *cagA*, è altamente immunogena e, una volta penetrata nelle cellule epiteliali, viene fosforilata ad opera di chinasi endocellulari. La forma fosforilata induce distruzione delle *tight* e delle *adherent junctions* e perdita di polarità della cellula stessa tramite segnali che la proteina invia direttamente all'actina del citoscheletro (Frisan *et al.*, 2012). Inoltre la CagA induce attivazione indiretta di alcuni fattori di trascrizione, come il NF- κ B e la β -catenina causando sovra-regolazione di alcuni geni come c-Myc e ciclina D1, ciò provoca modificazioni del ciclo cellulare che portano a prolungamento della fase G1-s e aumentano la sopravvivenza cellulare. Tale potenziale oncogenico è stato dimostrato in modelli murini transgenici, tanto che *H. pylori* risulta essere l'unico battere classificato come carcinogeno per l'uomo dalla International Agency for Research on Cancer (IARC) e dalla World Health Organization (WHO). Il gene CagA, posseduto da circa il 50-70% degli *H. pylori*, è anche un *marker* per la presenza nel genoma di isole di patogenicità (PAI) in grado di codificare proteine che formano un apparato di secrezione di tipo IV dotato di una struttura simile a una siringa in grado di penetrare le cellule epiteliali facilitando la traslocazione della proteina CagA, di peptidoglicani e altri fattori batterici (Frisan *et al.*, 2012; Kusters *et al.*, 2006).

La proteina **VacA** (*Vacuolating cytotoxin*), secreta da circa il 50% degli isolati di *H. pylori*, è una citotossina in grado di indurre vacuolizzazione massiva nella parete delle cellule epiteliali. Questa tossina, infatti, forma pori nelle membrane cellulari delle cellule epiteliali inducendo la liberazione di urea e anioni dalle cellule ospite e favorendo la permeabilità di membrana con conseguente liberazione di fattori nutritivi e cationi. La maggior parte di tossina secreta, però, non viene rilasciata nell'ambiente esterno, ma rimane associata alla parete esterna del battere cosicché quando il battere viene in contatto con le cellule dell'ospite, gruppi di questa tossina vengono trasferiti sulla cellula dove possono esplicare la loro attività patogena. La VacA, inoltre, è in grado di entrare nel citoplasma e accumularsi nella membrana interna dei mitocondri, dove attiva i canali endogeni dei mitocondri e induce apoptosi. Questo effetto apoptotico dipende dal tipo cellulare e potrebbe essere limitato alle sole cellule parietali, cosa che potrebbe risultare in una riduzione della

secrezione acida. Oltre alla penetrazione nelle cellule epiteliali, questa tossina sembra poter arrivare anche nei tessuti profondi, dove si troverebbe ad interagire con granulociti, monociti, linfociti B e T, inibendo la presentazione dell'antigene e la proliferazione dei linfociti T (Kusters *et al.*, 2006).

Per quanto riguarda gli *Helicobacter* gastrici non-*H. pylori* (NHPH – *non helicobacter pylori helicobacters*), in bibliografia sono disponibili molte meno informazioni riguardo i meccanismi di patogenicità. Tutti gli *Helicobacter* gastrici possiedono il gene che codifica per l'ureasi, esattamente come *H. pylori*, e flagelli che possono essere monopolari, bipolari o peritrichi, in quantità da 2 a 23. Nella maggior parte dei NHPH non è ancora stato descritto un recettore omologo al TlpB (ad attività chemiotattica) ma sembra che esista comunque un meccanismo simile che garantisce loro di allontanarsi dagli ambienti acidi; per *H. suis*, invece, è stato identificato, dopo sequenziamento del genoma, un gene che possiede il 98% di omologia al TlpB di *H. pylori*. (Haesebrouck *et al.*, 2009; Veermote *et al.*, 2011). Similmente non si conosce ancora molto riguardo le adesine espresse da questi batteri, nonostante sia noto che alcuni di questi possono localizzarsi in stretto contatto con le cellule epiteliali (ad esempio *H. felis* si localizza in prossimità delle cellule parietali, *H. suis* vicino alle parietali e alle cellule che producono muco e *H. mustelae* si trova fermamente adeso all'epitelio gastrico). Nel caso di *H. suis* sono stati trovati geni simili a quelli della famiglia delle OMP (*outer membrane protein*), che codificano per adesine, mentre dal sequenziamento è emerso che nel genoma di *H. suis* mancano geni omologhi a *babA*, *babB*, *sabA* e *sabB* (Veermote *et al.*, 2011). Questo battere, però, contiene un gene che codifica per una proteina legante il fibrinogeno o la fibrinonectina, fattore che potrebbe aumentare la capacità adesiva a seguito di danno epiteliale e conseguente esposizione di fibronectina della matrice extracellulare. Allo stesso modo anche *H. felis*, *H. canadensis* e *Wolinella Succinogenes* sembrano produrre la medesima proteina (Veermote *et al.*, 2011). Infine, anche se non sono presenti o espressi geni omologhi a CagA e VacA negli NHPH, si conoscono alcuni degli effetti di questi batteri, ad esempio *H. felis* è in grado di provocare apoptosi massiva e necrosi delle cellule parietali in gerbilli infetti sperimentalmente, inoltre, così come *H. suis*, induce apoptosi in linee cellulari epiteliali di topo (GSM06) e di adenocarcinoma gastrico umano (AGS). Un omologo della VacA è stato descritto nel genoma di *H. suis*, ma sembra che codifichi per una citotossina non funzionante, allo stesso modo, nonostante siano stati individuati alcuni omologhi ai membri del *cagPAI* di *H. pylori*, la maggior parte dei geni codificanti per CagA non sono stati trovati nel genoma di *H. suis* (Veermote *et al.*, 2011). Un ultimo fattore, la **GGT** (Γ-Glutamyl-Transpeptidasi), in grado di provocare apoptosi nelle cellule epiteliali gastriche e di inibire la proliferazione dei linfociti T, è presente sia in *H. pylori* sia negli altri *Helicobacter* gastrici (Haesebrouck *et al.*, 2009).

3.2.2 *HELICOBACTER* SPP. ENTEROEPATICI

Questo gruppo di *Helicobacter* spp. condivide uno dei suoi maggiori fattori di patogenicità con altri batteri, tra cui *Campylobacter* spp. ed altre enterobatteriacee: la CDT (*Cytolethal-distending-toxin*). Questa molecola, la cui struttura e attività sono

spiegate nel capitolo riguardante *Campylobacter* spp. (Capitolo 2), è stata trovata in numerose specie di *Helicobacter* enteroepatici tra cui: *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. mastomyrinus*, *H. cinaedi*, *H. pullorum* e *H. winthamensis* (Jinadasa *et al.*, 2011). Studi sperimentali su modelli murini condotti con *H. hepaticus* e *H. cinaedi* hanno permesso di ipotizzare che questa tossina contribuisca alla virulenza del battere. Utilizzando mutanti di *H. hepaticus* CdtB-negativi, comparati con il ceppo selvaggio, in animali sperimentalmente inoculati per via orale è stato possibile registrare una *clearance* intestinale maggiore del battere stesso, dato che ha permesso di ipotizzare che la CdtB abbia un ruolo nella resistenza alle difese dell'ospite. Inoltre entrambi i ceppi, mutanti e di campo, possono indurre infiammazione epatica subito dopo l'infezione, ma solo in topi inoculati col ceppo selvaggio si osservano alterazioni displastiche 10 mesi dopo l'inoculazione (Jinasada *et al.*, 2011). Inoltre è stato dimostrato che la Cdt presente in *H. hepaticus* è in grado di mediare l'apoptosi tramite l'attivazione della caspasi 3, 7 e 9, confermando il ruolo di questa tossina nelle reazioni apoptotiche mitocondriali (Smet *et al.*, 2011). Un sistema di secrezione di tipo IV (T6SS), come per *H. pylori*, è stato osservato anche in *H. hepaticus*, in cui tale meccanismo sembra promuovere una relazione simbiotica tra battere e ospite. In questo caso il sistema T6SS limita l'attività invasiva del battere sulle cellule epiteliali intestinali e inibisce l'attività infiammatoria favorendo l'equilibrio con l'ospite. *H. hepaticus* è anche in grado di modulare l'attività infiammatoria dei macrofagi aumentando la fagocitosi e la resistenza a stimolazioni secondarie, riducendo nel complesso lo stimolo pro-infiammatorio (Smet *et al.*, 2011).

3.2.3 RUOLO PATOGENO DI *HELICOBACTER* SPP. NELL'UOMO

In medicina umana la specie di *Helicobacter* maggiormente conosciuta e studiata è sicuramente *H. pylori*. La sua prevalenza in Europa è maggiore del 15% nei bambini e arriva a valori superiori al 60% negli adulti, con maggior distribuzione nei paesi in via di sviluppo rispetto a quelli industrializzati. È oramai noto che questo battere è una delle maggiori cause di ulcera peptica nell'uomo e la sua presenza in ambiente gastrico costituisce anche un elevato fattore di rischio nello sviluppo di gastrite atrofica, adenocarcinoma gastrico e linfoma del MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*). L'attività infiammatoria maggiormente evidente si localizza a livello di mucosa dell'antro pilorico, predisponendo allo sviluppo di iperacidità e ulcera duodenale. La terapia che permette l'eradicazione di questo battere si è rivelata efficace nella trattamento del linfoma gastrico associato al MALT (unico tumore trattabile con antibiotici) e di altre manifestazioni patologiche, quali anemia da carenza di ferro e porpora trombotica trombocitopenica idiopatica, la cui connessione con *H. pylori* non ha ancora trovato una spiegazione solida (Lawson *et al.*, 2011).

L'infezione da altri *Helicobacter* spp. gastrici nell'uomo è considerata poco comune, con prevalenze che variano da 0,3% (nei paesi sviluppati) al 6% e comprendono infezioni da *H. salomonis*, *H. felis*, *H. suis* e "*Candidatus Helicobacter bovis*" che indicano come gatti, cani, suini e bovini possano essere considerati fonti d'infezione, nonostante non si conosca la via di trasmissione (Lawson *et al.*, 2011).

Per gli *Helicobacter* spp. enteroepatici, invece, sono numerose le specie ritrovate in pazienti umani con manifestazioni cliniche, tra cui: *H. bilis*, *H. canadensis*, *H. canis*, *H. cinaedi*, *H. fennelliae*, *H. pullorum* e “*H. winghamensis*”. Prevalentemente questi batteri vengono isolati da pazienti immunodepressi, malati di AIDS, in trattamento con farmaci chemioterapici o affetti da alcolismo cronico, dove si associano a proctiti, gastroenteriti, meningiti neonatali e batteriemia (Lawson *et al.*, 2011).

3.3 Ruolo patogeno di *Helicobacter* spp. nel suino domestico e selvatico

La principale specie di *Helicobacter* che si può trovare nello stomaco di suino è *H. suis*, il quale è stato associato alla presenza di lesioni gastriche di varia entità sia in situazioni naturali che sperimentali. L'inoculazione di *H. suis* in suinetti di 6 mesi di età ha permesso di confermare la presenza di ipercheratosi e ulcere nella porzione non ghiandolare della mucosa gastrica di tutti i soggetti inoculati, al contrario di quanto avvenuto per i controlli (Haesebrouck *et al.* 2009). Questo battere colonizza lo stomaco del suino prevalentemente nelle porzioni di antro pilorico e mucosa fundica, mentre è meno presente nella porzione rivestita da mucosa cardiaca. Le due porzioni non ghiandolare e cardiaca, nell'insieme, comprendono circa il 50% della superficie gastrica e presentano un pH che, grazie alla saliva e alla secrezione di bicarbonati, si mantiene tra 5 e 7. Le altre porzioni, invece, presentano pH inferiori a causa della presenza di ghiandole adibite alla secrezione acida, necessaria a trasformare la pepsina in pepsinogeno. Normalmente, quindi, nello stomaco del suino sono presenti due compartimenti separati a pH differenti e condizioni enzimatiche distinte ma, qualsiasi condizione in grado di modificare questa compartimentazione, sembra favorire il contatto dell'epitelio squamoso stratificato della porzione aghiandolare con le sostanze acide della porzione ghiandolare distale, incluse bile (derivante dal reflusso) e pepsina. Ovviamente, i fattori che possono causare questa condizione sono molteplici, generalmente si considerano tutti i fattori che possono incrementare la fluidità del contenuto gastrico alterando il gradiente di pH tra le due porzioni, tra cui la granulometria dell'alimento, la presenza di carboidrati altamente fermentabili, fattori stressanti e così via (Haesebrouck *et al.*, 2009). *H. suis* può intervenire in questo meccanismo aumentando la secrezione di succhi gastrici in misura tale da permettere alla porzione aghiandolare di venire in contatto con l'acido cloridrico. La localizzazione del battere in stretto contatto con le cellule parietali, infatti, può indicare che lo stesso possa influenzare l'attività di queste cellule la cui prerogativa è favorire la produzione di acido cloridrico. Inoltre, studi sperimentali dimostrano che, in seguito a infezione sperimentale con *H. suis*, aumenta la proporzione di cellule produttrici di gastrina a discapito di quelle produttrici di somatostatina e, poiché la gastrina stimola la secrezione acida (all'opposto della somatostatina), si può ulteriormente confermare l'azione “iperacidificante” del battere in ambiente gastrico.

Oltre alla formazione delle ulcere gastriche nella porzione aghiandolare (*pars esophagea*), si può notare anche, in corso di infezione da *H. suis*, gastrite variabile

localizzata prevalentemente nell'antro pilorico (Haesebrouck *et al.*, 2009). Nel suino l'infezione naturale con *H. suis* provoca lesioni macroscopicamente evidenti soprattutto a carico della *pars esophagea*, con gradi variabili di ipercheratosi fino a erosioni e ulcere ma, istologicamente, si possono apprezzare nella porzione antrale, dove si trovano più frequentemente questi microrganismi, vari gradi d'infiltrazione infiammatoria composta da mononucleati con occasionali neutrofili e follicoli linfoidi. Lo stesso aspetto macro e microscopico, con lesioni ulcerative nella porzione esofagea e gastrite follicolare nella regione antrale, è stato descritto da Casagrande Proietti *et al.* (2010) in stomaci di suini prelevati al macello. Nel loro studio, da 400 suini esaminati, sono state evidenziate ulcere della *pars esophagea* nel 93% dei casi. Una parte di campioni con ulcera sono stati sottoposti a PCR per genere *Helicobacter* che è risultata positiva nel 49% dei casi, mentre la porzione antrale risultava positiva nel 53% dei casi, anche se non erano evidenti lesioni macroscopiche. La presenza di *Helicobacter suis* sia a livello di *pars esophagea* sia nella mucosa antrale, in presenza di lesioni ulcerative limitate alla zona esofagea, è stata spiegata dagli stessi autori con il meccanismo di alterazione di acidità riportato anche da Haesebrouck *et al.* (2009), associato alla maggior sensibilità della porzione aghiandolare priva delle difese fisiche costituite dal muco gastrico (Casagrande Proietti *et al.*, 2010).

Le caratteristiche istopatologiche correlate alla presenza di *H. suis* (allora denominato ancora "*Candidatus H. suis*" o *H. heilmannii*) nello stomaco di suino sono state descritte anche da Park *et al.* (2004) che hanno valutato sezioni istologiche di mucosa pilorica (in prossimità del *torus pyloricus*) sia colorate con ematossilina-eosina sia con impregnazione argentea e hanno caratterizzato la gastrite secondo un sistema di *score*, già descritto nel 2000 (Park *et al.*, 2000) che comprende una scala di valori da 0 a 4, associando a questa il grado di densità dei batteri microscopicamente evidenti da nessuno (-) a >50/HPF (+++). In questo studio gli autori non hanno trovato differenze significative nel grado d'infiammazione tra i soggetti positivi per *Helicobacter* spp. (40) e quelli negativi (2), ma il ridotto numero di soggetti negativi al battere (2/42) secondo gli stessi autori potrebbe aver influenzato il risultato finale (Park *et al.*, 2004). Lo stesso sistema di *score* applicato quattro anni prima dagli stessi autori (Park *et al.*, 2000) infatti, aveva dato risultato differenti: la differenza tra i punteggi istologici medi ottenuti dai campioni di mucosa pilorica positivi ($3,25 \pm 0,25$) rispetto ai negativi ($2,37 \pm 0,72$) risultava essere statisticamente significativa ($p < 0,05$).

Nello stomaco di suino non sono stati trovati molti altri *Helicobacter* spp. se non *Flexispira*, *H. bilis* o *H. trogontum*, che sono comunque *Helicobacter* enteroepatici la cui capacità di colonizzare lo stomaco rimane ancora da valutare (Roosendaal *et al.*, 2000; Haesebrouck *et al.*, 2009). Anche tra gli *Helicobacter* enetroepatici, nel suino sono stati riscontrati prevalentemente *H. bilis* e *H. trogontum* da campioni fecali, mentre sempre dalle feci in un solo caso è stato isolato *H. pametensis* (Dewhirst *et al.*, 1994; Hanninen *et al.*, 2003).

Al contrario di quanto accade nel suino, le indagini sulla presenza di questi microrganismi nel cinghiale sono esigue, solo in due studi, di cui uno solo svolto sull'animale in libertà, si tratta la presenza di batteri spirillari riferibili ad *Helicobacter* spp. in campioni di feci o di stomaco (Abu Al-Soud *et al.*, 2003; Fabisiak *et al.*, 2010). Le ricerche condotte su campioni fecali di cinghiale dello zoo di Copenhagen hanno permesso di identificare, solo tramite PCR-DGGE (PCR-*denaturing gradient electrophoresis*), un ceppo di *Helicobacter* spp. di cui non è stata indagata la specie, ma la cui sequenza presentava il 98% di similarità con *H. winthamensis*. La sola valutazione del campione fecale, però, non ha permesso d'identificare l'eventuale presenza di lesioni gastriche o enteriche correlate.

Nello studio condotto da Fabisiak *et al.* (2010), invece, un *Helicobacter* spp. con elevata similarità a *H. Heilmannii* tipo 2 è stato ritrovato nella mucosa gastrica di 1 soggetto dei 17 campionati. In questo caso i batteri sono stati sottoposti a PCR e sequenziamento del gene 16s rRNA, ed osservati microscopicamente nei tessuti campionati. Nel soggetto positivo la mucosa gastrica non mostrava lesioni sia macro che microscopicamente evidenti particolarmente differenti rispetto ai soggetti negativi, inoltre, la valutazione del grado d'infiammazione in tutti i soggetti campionati è stata resa piuttosto difficile dalla presenza di parassiti quali nematodi adulti, già evidenti nel lume gastrico di due soggetti, e inclusi in granulomi nello spessore della mucosa. Generalmente, comunque, è stato osservato in tutti i campioni un lieve o moderato infiltrato infiammatorio linfoplasmocitario e un consistente numero di granulociti eosinofili, inoltre, il grado d'infiammazione sembrava essere sempre inferiore nella porzione fundica o cardiaca rispetto a quella antrale. L'esame istologico con colorazione di Giemsa, nell'unico soggetto positivo, ha comunque permesso l'identificazione di alcuni batteri spirillari nel lume della porzione superficiale delle ghiandole gastriche della porzione antrale, mentre non sono stati osservati microrganismi nella *pars esophagea*, nella porzione cardiaca o nella fundica. La conclusione a cui giungono gli autori riguarda la prevalenza osservata in questo studio: il reperto di un solo soggetto positivo su 17 campionati non può dare indicazioni sulla reale prevalenza di questo battere nella popolazione e non si può escludere che si tratti di un'infezione occasionale avvenuta a seguito del contatto con un suino domestico infetto, allo stesso tempo, però, aver trovato un soggetto positivo con un campionamento di soli 17 animali su una popolazione molto più ampia potrebbe offrire spunti sulla ricerca degli *Helicobacter* spp. nel cinghiale selvatico.

Capitolo 4

ANTIBIOTICORESISTENZA: INTRODUZIONE AL MONITORAGGIO NEI SELVATICI

4.1 Introduzione

L'inquinamento da farmaci, non solo di natura antimicrobica, è un problema sanitario emergente che ha portato alla nascita di numerose ricerche e di sistemi di sorveglianza. I farmaci, sia destinati all'uso umano sia veterinario, diventano inquinanti ambientali ubiquitari che possono contaminare l'ambiente da diverse fonti. In aggiunta alla dispersione del farmaco nell'ambiente, a causa di sistemi di smaltimento impropri, esistono altre fonti di diffusione tra cui, in misura maggiormente rilevante, si annovera proprio il paziente stesso (Zuccato *et al.*, 2007). Non tutti i farmaci, infatti, vengono metabolizzati e inattivati dall'organismo; molti vengono escreti con le urine o con le feci in forma attiva e, tramite le acque reflue, raggiungono fiumi e laghi dove permangono anche per molto tempo. È stato calcolato che più del 70-80% dell'inquinamento ambientale da farmaci abbia quest'origine, al contrario, le altre fonti (reflui dalle industrie, smaltimento improprio o illegale) contribuiscono per il restante 20-30%.

Una volta nell'ambiente il farmaco può essere degradato in tempi brevi o molto lunghi (eritromicina, ciclofosfamide > 1 anno), con possibilità di accumulo. Nonostante la concentrazione di queste sostanze nelle acque rimanga molto bassa (mg/m³) è necessario considerare che sono molecole molto attive e che l'eventuale accumulo sottopone i microrganismi e la fauna acquatica a esposizione cronica. Queste considerazioni hanno portato ad alcune ricerche nell'ambito dell'inquinamento delle acque in Europa e in Italia, campionando secondo il principio del calcolo del "carico ambientale", ovvero il prodotto del quantitativo di farmaco venduto per la sua percentuale di metabolizzazione. Su questo calcolo sono stati individuati farmaci "prioritari" in base ai quali sono state identificate tecniche di individuazione tramite metodiche altamente specifiche e sensibili (cromatografia liquida abbinata alla spettrofotometria di massa). I risultati di questi studi hanno evidenziato la presenza di antibiotici (lincomicina e eritromicina), antitumorali (ciclofosfamide), antinfiammatori (ibuprofene), diuretici (furosemide), antidepressivi e altri farmaci nelle acque dei fiumi del Nord - Italia (Po, Lambro, Adda) e altri antibiotici (chinoloni, tetracicline, macrolidi-lincosamidi, penicilline), antinfiammatori, antidepressivi, ormoni e altre sostanze nei fiumi e laghi europei. Alcuni farmaci usati illegalmente a scopi auxinici in medicina veterinaria, come salbutamolo e lincomicina, sono stati trovati in concentrazioni elevate nelle acque del fiume Po, in vicinanza di aree a spiccata attitudine zootecnica (Zuccato *et al.*, 2007). Questo problema, in genere, riguarda tutti i farmaci prodotti, poiché le conseguenze

che possono derivare dall'accumulo di farmaci citotossici, ad attività ormono-simile o mutageni nell'ambiente potrebbero assumere dimensioni importanti.

In questo capitolo verrà approfondito, in particolare, l'aspetto che riguarda gli antibiotici, sostanze usate spesso in maniera impropria o superficiale. L'inquinamento ambientale da antibiotici può influenzare la selezione di ceppi batterici meno sensibili o addirittura resistenti a diverse molecole ad attività antimicrobica. La fauna selvatica, in questo caso, gioca un ruolo fondamentale. I batteri normalmente presenti nell'apparato gastroenterico di questi animali possono venire in contatto con i diversi inquinanti a base antibiotica presenti nell'ambiente, modificando la sensibilità alle stesse molecole. L'osservazione dei diversi gradi di sensibilità o delle resistenze manifestate da indicatori fecali isolati dalla fauna selvatica, quindi, potrebbe indirettamente fornire indicazioni sullo stato di inquinamento ambientale da antibiotici in riferimento alla aree abitate dalla fauna campionata

4.2 Meccanismi di antibioticoresistenza

Nei confronti di un antimicrobico un battere si può presentare in differenti modi: può essere sensibile, presentare resistenza intrinseca o resistenza acquisita.

La resistenza **intrinseca** è propria di tutti i membri di un gruppo tassonomico e deriva da caratteristiche strutturali o biochimiche proprie dei microrganismi considerati. Un esempio è la resistenza dei batteri gram negativi ai macrolidi, essi infatti agiscono all'interno della cellula batterica, ma a causa delle loro dimensioni non possono penetrare attraverso la parete cellulare di questi batteri, non riuscendo a raggiungere il *target* d'azione.

La resistenza agli antibiotici può essere anche **acquisita** tramite variazioni genetiche che possono manifestarsi con notevoli variazioni di MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) o con modificazioni progressive dovute ad acquisizione progressiva di antibiotico resistenza (come accade per i fluorochinoloni) (Boerlin & White, 2006). Brevemente, i meccanismi mediante i quali i batteri possono manifestare resistenza si possono riassumere in tre categorie: 1) inattivazione enzimatica (produzione di enzimi come ad esempio lattamasi o cefalosporinasi); 2) alterazione del recettore specifico dell'antibiotico (ad esempio ribosomi o proteine leganti la penicillina); 3) mancato raggiungimento del sito bersaglio (pompe specifiche che espellono la molecola dall'interno della cellula o riduzione della permeabilità di membrana).

La resistenza acquisita può manifestarsi verso un singolo farmaco, alcuni agenti della stessa classe di antimicrobici, un'intera classe degli stessi o verso molecole di classe differenti.

L'acquisizione di resistenza può avvenire tramite modificazioni genetiche nel corso di normali processi fisiologici (mutazioni), oppure dall'acquisizione di geni di resistenza esterni alla cellula batterica o, ancora, può manifestarsi una combinazione di questi due meccanismi. L'instaurarsi di mutazioni, ad ogni modo, è favorito

dall'incremento delle condizioni di stress a cui la popolazione batterica è sottoposta, ivi incluso lo stato di pressione che si instaura durante la lotta tra patogeno e difese dell'ospite, portando allo sviluppo di resistenze in vivo nei periodi di trattamento con antibiotici come fluorochinoloni. La maggior parte delle resistenze, però, s'instaurano tramite modificazioni del genoma batterico a seguito di trasferimento orizzontale di materiale genetico tra batteri, che può avvenire tramite:

- 1) internalizzazione di frammenti di DNA presente nell'ambiente extracellulare da parte di batteri naturalmente competenti (**trasformazione**)
- 2) acquisizione di frammenti di DNA tramite batteriofagi (**trasduzione**)
- 3) trasferimento diretto di materiale genetico tramite plasmidi (**coniugazione**).

I plasmidi sono elementi genetici extra-cromosomiali, non necessari alla sopravvivenza del battere e in grado di replicarsi autonomamente. Questi elementi possono trasportare geni che conferiscono ai batteri nuovi caratteri, come, ad esempio, la resistenza agli antibiotici o la possibilità di produrre enzimi. Il materiale genetico in grado di conferire questa resistenza può muoversi tra diversi batteri, come visto finora, oppure all'interno del genoma dello stesso battere, attraverso **trasposoni** (che si muovono da una parte all'altra dei cromosomi) o **integroni**, ovvero elementi di DNA mobile nella cui porzione centrale possono essere inseriti "geni cassetta" che possono essere anche disposti in *tandem* e conferire diversi tipi di resistenza (Boerlin & White, 2006).

4.3 Antibioticoresistenza: monitoraggio nella fauna selvatica

L'importanza del monitoraggio dell'antibioticoresistenza è stata colta anche dalla Comunità Europea che, a partire dal 1998, promuove ricerche sull'antibioticoresistenza all'interno di un piano di sorveglianza europeo, fino a considerare questo fenomeno alla stregua di una zoonosi trasversale. Questo ha portato ad una direttiva, 2003/99/EEC, che raccomanda ai paesi membri di costituire un sistema di monitoraggio della resistenza agli antimicrobici nelle produzioni animali.

In Italia, per quanto riguarda la medicina veterinaria, sono stati attivati progetti nazionali che, a partire da diversi Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZZSS), con a capo l'IZS delle regioni Lazio e Toscana, hanno portato alla nascita, nel 2003, del Centro Nazionale di Referenza per l'Antibioticoresistenza (CRAB). Il CRAB si occupa di raccogliere dati provenienti da diverse regioni italiane riguardo alle resistenze e multiresistenze in animali da reddito e da compagnia, elaborandoli per ottenere informazioni riguardo lo stato di diffusione ed emergenza del fenomeno di resistenza. Le specie batteriche che vengono usate per ottenere queste informazioni sono state suddivise in tre categorie: 1) patogeni animali (*Pasteurellaceae*, *Escherichia coli* e altri); 2) batteri zoonotici (*Salmonella* spp. e *Escherichia coli*) e 3) batteri indicatori (*Enterococchi* spp. e *Escherichia coli*).

Lo stato di antibioticoresistenza nella fauna selvatica è un argomento di cui si trova ancora poco in letteratura. Secondo alcuni studi la flora enterica di mammiferi che

hanno scarsi o nulli contatti con l'uomo o fonti antropiche di contaminazione potrebbe avere livelli irrisori di antibioticoresistenza, al contrario, laddove la fauna selvatica è in stretto contatto con la popolazione umana o i suoi derivati, i livelli di resistenza agli antimicrobici potrebbero essere più elevati (Österblad *et al.*, 2001). Quest'ipotesi, meriterebbe di esser approfondita attraverso mappature spaziali e temporali del fenomeno dell'antibioticoresistenza nell'ambiente naturale (Österblad *et al.*, 2001).

Uno dei primi studi in merito a quest'argomento è stato condotto nelle isole di Krakatau e West Java, in Indonesia, nel 1988 (Graves *et al.*, 1988). Gli autori, in questo lavoro, hanno voluto comparare la flora enterica, e la sua relativa antibioticoresistenza, in mammiferi abitanti in un'area densamente popolata (Java) rispetto a mammiferi (roditori e pipistrelli) di un'area geografica non abitata (Krakatau). Le differenze sostanziali tra queste due popolazioni microbiche erano rappresentate dalla totale assenza di *S. faecalis* nella flora enterica dei mammiferi di Krakatau, al contrario di quanto riscontrato nell'isola di Java, e nella presenza di *E. coli* e *Klebsiella* tetraciclina-resistenti in ratti dell'isola di Java, a fronte della totale assenza di antibioticoresistenza nella flora enterica dei ratti di Krakatau. *S. faecalis* è un battere comunemente isolato dall'intestino umano, motivo per cui viene considerato un buon indicatore di inquinamento fecale umano ambientale. L'isola di Java è intensamente popolata e le condizioni igieniche e di smaltimento dei liquami umani non sono strettamente regolate; secondo gli autori questa condizione giustificava la presenza di questo battere nella popolazione di ratti, così come la resistenza alle tetracicline riscontrata in *E. coli* e *Klebsiella*, veniva giustificata dalla larga vendita, senza prescrizione medica, di questo e numerosi altri antibiotici (Graves *et al.*, 1988).

Inoltre, altri studi, condotti in Australia nel 2000, dimostrano che esistono altri fattori, come il ceppo batterico, la localizzazione geografica e la specie-ospite, che intervengono nella variabilità dell'antibioticoresistenza (Sherley *et al.*, 2000). Questo potrebbe essere determinato dal fatto che diverse specie ospite in differenti aree geografiche vengono in contatto con gruppi umani di origine diversa, anche se sono state riscontrate resistenze in ceppi batterici di regioni remote in cui il contatto con l'uomo è improbabile. È quindi possibile che alcune resistenze non siano dovute specificamente all'esposizione all'antibiotico, ma riflettano meccanismi generali di resistenza come, ad esempio, condizioni correlate alla permeabilità di membrana. Alcuni dei geni collegati all'antibioticoresistenza, infatti, erano presenti nelle popolazioni batteriche già prima che l'uomo iniziasse ad utilizzare queste molecole a scopo terapeutico, probabilmente come meccanismi attuabili nella competizione per la nicchia ecologica (Sherley *et al.*, 2000).

Studi condotti in Canada hanno dimostrato che, nonostante ceppi di *E. coli* antibioticoresistenti siano stati isolati sia da mammiferi allo stato selvatico che provenienti da allevamenti di suini, esiste una correlazione statisticamente significativa tra la presenza di resistenze alla tetraciclina e origine

(selvatica/domestica) dei ceppi di *E. coli* isolati da diversi mammiferi (topi, toporagni e arvicola) (Kozak *et al.*, 2009).

Anche in Europa il numero di studi in proposito è limitato: alcune indagini sono state condotte in Inghilterra, Finlandia, Portogallo, Germania e centro-Europa (Gilliver *et al.*, 1999; Österblad *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2006; Schierack *et al.*, 2009; Literak *et al.*, 2010). Alcuni di questi lavori hanno riportato fenomeni di antibioticoresistenza in feci di roditori viventi nelle aree del nord-ovest dell'Inghilterra (Gilliver *et al.*, 1999), in rapaci, cervi, volpi e gufi in Portogallo (Costa *et al.*, 2006) e mammiferi in centro-Europa (Literak *et al.*, 2010), mentre in altri casi tutti i ceppi di *E. coli* o indicatori fecali isolati si sono mostrati sensibili alle molecole testate (Österblad *et al.*, 2001; Schierack *et al.*, 2009).

In particolare in centro-Europa (Repubblica Ceca e Slovacchia) tra numerosi animali testati (piccoli e grandi mammiferi), risultati interessanti sono stati ottenuti dai cinghiali, dove alcuni ceppi di *E. coli* isolati si sono rivelati essere multiresistenti. Questi ceppi, inoltre, presentavano un gene, legato alla produzione di beta-lattamasi, frequentemente riscontrato nell'uomo e negli animali da reddito. In un solo cinghiale, inoltre, era presente un ceppo di *E. coli* portante un gene generalmente albergato da Salmonelle non-tifoidi di origine umana. Questi dati, secondo gli autori, potevano suggerire che *E. coli* produttori di beta-lattamasi ad ampio spettro, di origine umana e da animali da reddito, stessero colonizzando animali selvatici che potevano così divenire serbatoi e vettori di questi stessi ceppi. In maggior misura questo problema potrebbe riguardare animali come il cinghiale, molto diffusi, in grado di vivere molto vicino ad ambienti urbani, onnivori e possibili frequentatori di discariche e aziende agricole e, infine, cacciati e comunemente trasformati in prodotti edibili.

È necessario però indicare che, al contrario di quanto riscontrato da Literak *et al.* (2010), studi condotti in Germania nel 2009 non hanno osservato nessuna resistenza in ceppi di *Escherichia coli* isolati da cinghiali, anche se hanno rilevato una differenza nel grado di sensibilità manifestato da ceppi provenienti da suini domestici e dai cinghiali testati (Schierack *et al.*, 2009).

Capitolo 5

IL CINGHIALE: ECOLOGIA E GESTIONE DELLA POPOLAZIONE NELLE AREE PROTETTE

5.1 Tassonomia, diffusione e morfologia

Il cinghiale appartiene all'ordine *Artiodactyla*, famiglia *Suidae*, genere *Sus scrofa*. La distinzione in sottospecie risulta ancora confusa per due motivi essenziali: le attività di ibridazione con conspecifici domestici condotte dall'uomo e gli incroci tra razze evolutesi in zone differenti e trasportate dall'uomo in ambienti non originari per favorire il ripopolamento. Esistono 16 sottospecie riconosciute, ma ci si limita usualmente a identificare, proprio per le incertezze sulla reale sistematica della specie, quattro raggruppamenti geografici: razze occidentali, indiane, orientale e indonesiane.

La forma autoctona delle aree del nord Italia si è estinta prima di poter studiarne le caratteristiche, per cui in Italia rimangono due sottospecie endemiche: *Sus scrofa majori*, in Maremma e *Sus scrofa meridionalis*, in Sardegna (Carnevali *et al.*, 2009). Alcuni studi condotti con analisi craniometriche e elettroforetiche, hanno evidenziato come la sottospecie sarda si differenzi notevolmente dalle altre presenti in ambiente mediterraneo, mentre quella maremmana non sembra stanzialmente diversa da *Sus scrofa scrofa* (giunta in Piemonte dalla Francia nel '900), presente nella maggior parte della penisola (Carnevali *et al.*, 2009).

Secondo dati pubblicati nel 2009 dall'ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) il cinghiale è l'ungulato ad oggi più diffuso sul territorio nazionale, ma sono carenti le informazioni sulla maggior parte del territorio, al contrario di quanto accade nelle aree protette, dove i dati sulla popolazione vengono raccolti nelle attività di monitoraggio previste all'interno dei piani di controllo della specie (Carnevali *et al.*, 2009). Tra i parchi in cui sono attivi il censimento della popolazione e i piani di controllo, quelli con il maggior prelievo annuale sono il Parco naturale della Maremma, con 432 capi, quello dei Gessi Bolognesi e Calanchi della Abbadessa, con 149 capi e il parco della Gola della Rossa e di Frasassi, con 406 capi.

Una situazione diversa si presenta per gli allevamenti di cinghiale: il numero di cinghiali detenuti in aree recintate si aggira intorno a 2700-2800 capi, con un numero medio per area recintata di 12,4. Generalmente, una problematica legata all'allevamento responsabile delle specie animali è il loro allevamento in aree in cui tali specie sono assenti allo stato brado, in questi casi le fughe dai recinti sono molto frequenti e possono portare alla colonizzazione del territorio da parte di specie alloctone, con problemi anche rilevanti nella gestione del territorio (Carnevali *et al.*, 2009). Questo problema è maggiormente sentito per il cinghiale, la cui immissione abusiva sul territorio è ancora praticata a scopo venatorio.

Morfologicamente il cinghiale euroasiatico presenta un corpo massiccio, con arti posteriori più lunghi degli anteriori e orecchie sempre erette e coda corta. Le dimensioni in Italia si aggirano sui 100 cm massimi di lunghezza per i maschi e 97cm per le femmine, mentre il peso arriva a massimo 100 Kg nei maschi e 70 Kg nelle femmine. Il mantello varia con l'età, per questo si riconoscono tre periodi: il primo, fino circa ai 3 mesi, in cui il mantello presenta delle strisce marroni scure su base nocciola (per questo i piccoli sono soprannominati "striati"), il secondo periodo, fino circa a 2 anni di età, in cui il mantello è marrone-rossiccio (individui chiamati "rossi") e, infine, dal secondo anno in poi, il mantello appare con una combinazione di marrone, grigio e giallastro.

La dentatura è uno dei mezzi con cui viene identificata l'età nei soggetti abbattuti. La tavola dentaria definitiva è composta da: 3/3 Incisivi; 1/1 Canini; 4/4 Premolari; 3/3 Molari; i canini, caratteristici del cinghiale, vengono soprannominati "coti" (quelli superiori) e "zanne", gli inferiori. L'aspetto affilato tipico dei canini è il risultato dello sfregamento continuo dei coti con le zanne, l'accrescimento di questi denti, infatti, è continuo e quest'opera di affilatura naturale permette al cinghiale di avere sempre canini affilati, potenti mezzi di attacco nelle lotte con altri maschi e di difesa da predatori (Massei & Genov, 2000).

5.2 Alimentazione

Il cinghiale è un onnivoro capace di alimentarsi con un'innumerabile quantità di risorse e capace di adattare la sua dieta alla disponibilità di alimenti nelle diverse stagioni e aree geografiche, proprio per questo motivo, forse, la sua diffusione è tanto estesa. Il cinghiale, come il suino, è una specie monogastrica, a differenza di altri ungulati poligastrici e ruminanti (come il cervo o il capriolo), per cui meno efficace nell'utilizzo dei vegetali. La dieta, quindi deve essere integrata con proteine di origine animale, anche se la componente vegetale riveste sempre la maggior quota di alimento ingerito (Schley & Roper, 2003). Sembra, però, che il consumo di alimenti di origine animale sia inversamente correlato all'età, ovvero sia maggiore nei soggetti giovani. Tra le componenti vegetali, in genere, il cinghiale inserisce nella dieta sempre almeno un alimento altamente energetico, come ghiande, faggine, castagne, pinoli, olive e cereali o altri prodotti di agricoltura (Schley & Roper, 2003). Sebbene questi alimenti siano intercambiabili, il cinghiale mostra alcune preferenze, ad esempio, se disponibili, preferisce sempre i frutti degli alberi ai prodotti dell'agricoltura o al cibo supplementare (mais) somministrato artificialmente.

Tra i cibi vegetali, quindi, quelli di cui il cinghiale si ciba sono, oltre ai frutti già citati, radici, piante verdi e, tra le colture, mais, orzo, grano, sorgo, patate, barbabietole, segale, avena piselli e fagioli. Il mais sembra il prodotto preferito tra quelli citati, anche per questo viene ampiamente utilizzato nella formulazione delle esche per la cattura (Schley & Roper, 2003).

Tra i prodotti di origine animale, invece, troviamo sia vertebrati che invertebrati. Dei primi nell'alimentazione del cinghiale sono inclusi piccoli mammiferi (roditori,

topiragni, talpe) e uccelli, inoltre il cinghiale non disdegna le uova, come quelle dei fagiani e dei volatili che in genere depongono in nidi a terra, abitudine che può causare, talvolta, un danno ecologico. Ad esempio, la presenza del cinghiale sembra avere influenze negative sulla riproduzione della beccaccia, a causa appunto dell'attività predatoria svolta sulle uova. Tra gli invertebrati, fanno parte dell'alimentazione del cinghiale molti insetti (anche le larve) e vermi, così come chioccioline e lumache (Schley & Roper, 2003).

Nonostante, come citato, il cinghiale preferisca, dove possibile, i frutti che trova in natura alle coltivazioni umane, rimane comunque chiaro come il consumo dei prodotti dell'agricoltura comporti un danno economico notevole, questo non tanto per la quantità di prodotto direttamente consumato, quanto per il danno che è riportato ai campi coltivati a seguito dell'attività di *rooting* (ovvero lo smottamento del terreno tramite il grugno) e dal calpestamento dello stesso terreno da parte di diversi individui (Schley & Roper, 2003).

5.3 Gestione del cinghiale nelle aree protette

Come già accennato, la gestione del cinghiale diventa fondamentale dal momento in cui l'elevata presenza di questo mammifero sul territorio è causa di problemi connessi alla convivenza con l'uomo e di problemi ecologici. I sistemi di gestione, però, non sono uniformi su tutto il territorio italiano, anzi, differiscono anche all'interno degli istituti di gestione della fauna che possiedono diverse finalità: ambiti in cui è prevista l'attività venatoria (Aziende Faunistico-Venatorie, ambiti territoriali di caccia) e ambiti in cui la caccia è completamente vietata (Parche Nazionali e Regionali). Questa disomogeneità nelle attività di gestione si riflette sulle aree protette di dimensioni molto limitate (da poche centinaia di ettari a poche migliaia), che rappresentano la maggior parte delle aree protette in Italia e che vengono così disperse all'interno del territorio cacciabile. In questo modo si creano dei fenomeni detti "*source-sink*" che vedono da un lato l'inefficacia delle opere di protezione limitate alle sole aree protette (*sink*), dall'altro la pesante influenza che deriva dai sistemi di gestione delle aree limitrofe sulle fluttuazioni demografiche (*source*), come accade nel così detto "effetto spugna", ovvero la maggior concentrazione dei cinghiali all'interno delle aree protette durante la stagione venatoria e successiva redistribuzione sul territorio al termine della stessa. Nei grandi parchi nazionali e Regionali, invece, una parte più o meno consistente della popolazione può considerarsi stabilmente residente anche se, soprattutto nelle aree periferiche, non sono assenti fenomeni di emigrazione o immigrazione dipendenti dalla ricerca di risorse trofiche o dalla pressione venatoria attuata all'esterno.

L'obiettivo principale di un piano di monitoraggio è la raccolta d'informazioni utili a valutare eventuali cambiamenti tra popolazione animale e convivenza con l'uomo. Il piano di monitoraggio viene svolto in maniera diversa in base all'obiettivo gestionale, ad esempio se l'obiettivo è la riduzione del conflitto tra popolazione animale e

popolazione umana residente le azioni gestionali conseguenti saranno piani di controllo numerico delle popolazioni animali.

L'attività di controllo delle popolazioni in Italia viene attuata per la prima volta nel Parco della Maremma negli anni '70, ma questo sistema ha preso piede solo negli ultimi 15 anni (dal 1995) (Monaco *et al.*, 2010). Le tecniche più applicate per il contenimento della popolazione si avvalgono dell'utilizzo dell'arma da fuoco o delle catture. L'arma da fuoco è utilizzata nel 73% delle aree protette e può essere impiegata con appostamento fisso, girata o abbattimento alla cerca. I mezzi di cattura, invece, sono usati dal 56% delle aree protette e si avvalgono di chiusini o gabbie. Le diverse tecniche possono essere usate singolarmente o in combinazione tra loro, a seconda delle caratteristiche ambientali delle aree considerate. Il destino dei soggetti catturati è, nell'84% dei casi, l'abbattimento, ma in alcuni casi si può optare per il rilascio o la vendita.

5.4 Il Parco regionale dei Gessi Bolognesi e Calanchi dell'Abbadessa (BO): descrizione del territorio e del piano di controllo per la gestione faunistica e sanitaria del cinghiale selvatico

Il parco Regionale dei Gessi Bolognesi, istituito nel 1988, consta di un'area complessiva di 4844 ettari localizzata sull'appennino bolognese e comprende le valli dei torrenti Savena, Zena, Idice e Quaderna, inoltre il parco comprende o tocca quattro comuni, Bologna e, nella provincia, Ozzano dell'Emilia, Pianoro e San Lazzaro di Savena. Il territorio del parco presenta una copertura boschiva modesta, composta da arbusteti, macchia e boschi di breve estensione, disposti a mosaico sul territorio, ma comprende anche aree coltivate, con sistemi sia di tipo intensivo (vigneti, frutteti, orticole), sia estensivo (cerealicole e foraggere). Il torrente Idice attraversa il parco, per motivazioni logistiche, quindi, si è proceduto ad identificare due aree dove applicare il modello di gestione, una ad Est e una ad Ovest del torrente. Ogni area è stata poi assegnata ad un "coauditore", ovvero un responsabile a cui affidare il coordinamento delle attività di controllo (Delogu *et al.*, 2007).

5.4.1 IL PIANO DI CONTROLLO "DENSITÀ-DIPENDENTE" DELLA POPOLAZIONE

La gestione demografica del cinghiale all'interno del Parco Regionale è nata per la necessità di conservare l'ambiente naturale e le specie animali e vegetali che si trovano all'interno dello stesso, come da normativa vigente (Legge quadro n. 394 6/12/1991 e Legge Regionale n. 11/88 con modifiche nella 40/92), al fine di mantenere gli equilibri esistenti e l'integrazione con l'uomo. Nonostante, quindi, il parco rientri nel modello di valutazione agro-forestale (secondo la carta delle vocazioni dell'Emilia Romagna) di densità ad obiettivo 0 per il cinghiale, non è stato scelto un piano di eradicazione della specie (presente in tutti i territori limitrofi al parco), ma è stata fissato un obiettivo di densità di 1-1,5 capi/100 ettari, secondo le nozioni sanitarie che prevedono una soglia di densità al di sotto della quale alcune malattie trasmissibili tendono ad estinguersi. In questo caso il riferimento numerico è

quello postulato per la Peste Suina Classica (PSC), secondo quanto stabilito da Hone *et al.* (1992).

L'attuazione del piano di controllo è cominciata nel 2002, dopo un'iniziale indagine demografica che ha cercato di stabilire la densità di popolazione dell'area considerata, e si è svolta con duplice modalità: il prelievo di un numero di animali stabilito annualmente e la marcatura di alcuni animali presenti nell'area, il tutto con lo scopo di ottenere una popolazione a densità "nota", definita strutturalmente per classi di età e sesso, ricreando una condizione simile a quella che si sarebbe verificata se sulla popolazione di cinghiali avessero agito soltanto fattori di mortalità naturali.

L'obiettivo gestionale è stato affiancato, inoltre, da un fine sanitario, ovvero il controllo di potenziali malattie trasmissibili all'interno della popolazione del Parco. Per questo scopo su tutti i cinghiali abbattuti sono stati eseguiti prelievi ematici e tamponi nasali per indagini su Circovirus suino Tipo 2 (PCV2), virus dell'Epatite E e virus della malattia di Aujeszky (Delogu *et al.*, 2007).

Per arrivare all'obiettivo di densità prefissato sono stati catturati e marcati gli animali che avrebbero costituito la popolazione finale, mentre sono stati catturati e abbattuti i soggetti considerati in esubero. La densità finale della popolazione, in base al riferimento numerico di 1-1,5 soggetti per ettaro, è stata stimata in 76 cinghiali totali in 5000 ettari. Il sistema di marcatura ha previsto l'utilizzo di marche auricolari siglate con PG (Parco Gessi) e il numero del cinghiale che sono state apposte ad animali di diverso sesso e età, in modo da ottenere una popolazione che si avvicinasse il più possibile a quella naturale, con rapporto maschio:femmina di circa 1:1 e una percentuale di giovani (fino ai 12 mesi) del 53% e di sub-adulti del 47%. Per l'abbattimento dei soggetti in esubero sono state utilizzate in combinazione tecniche di cattura-abbattimento e abbattimento all'aspetto. La cattura è stata preferita a causa dell'elevata presenza di soggetti giovani (è selettiva verso le classi di età giovanili), mentre l'abbattimento all'aspetto è stato attuato in determinati periodi dell'anno qualora si riduca l'efficacia del sistema di trappole o nel caso di colture danneggiate. La cattura, effettuata con chiusini (recinti di cattura) o gabbie di cattura, ha il vantaggio, rispetto all'abbattimento all'aspetto, di selezionare i soggetti da abbattere in base alla classe di età, senza creare disturbo a altri soggetti o altre specie. Dopo l'abbattimento ogni capo viene contrassegnato con una fascetta metallica inamovibile in cui è impresso un numero che permette di identificare il soggetto al fine della tracciabilità e dei controlli sanitari (controllo trichinosi dell'AUSL e ricerche scientifiche in corso) (Delogu *et al.*, 2007).

CONTRIBUTO SPERIMENTALE

Capitolo 6

STUDIO IMMUNOISTOCHIMICO DELL'INFEZIONE DA *LAWSONIA INTRACELLULARIS* NEL CINGHIALE SELVATICO

6.1 Introduzione

Pochi sono i riferimenti bibliografici ad indagini anatomo-isto-patologiche sull'infezione da *Lawsonia intracellularis* nel cinghiale (Zlotowski *et al.*, 2008). Questo perché, nella maggior parte degli studi condotti su questa specie animale, l'attenzione è rivolta alla rilevazione di anticorpi (sieroprevalenza) o di DNA batterico nel contenuto fecale tramite PCR, il tutto in assenza di indagini macro e microscopiche volte a individuare lesioni associate. Uno dei fattori scatenanti la malattia, come trattato nel Capitolo 1, sembra essere l'impatto del sistema di produzione e allevamento, così come la densità di popolazione e i fattori stressanti. Recenti studi hanno infatti dimostrato che la sieroprevalenza di *Lawsonia intracellularis* aumenta nel cinghiale qualora sia stabulato in allevamenti, come accade nel suino domestico (Hälli *et al.*, 2012). L'unico caso di cui si trattano le lesioni macro e microscopiche, infatti, riguarda 4 suini selvatici manifestanti sintomatologia da PE in un allevamento composto da 1250 capi in Brasile (Zlotowski *et al.*, 2008).

Considerate queste premesse, questo studio contenuto nel lavoro di tesi presenta diversi obiettivi: indagare la presenza di infezione da *Lawsonia intracellularis* nella popolazione di cinghiali del Parco regionale dei Gessi Bolognesi; valutare, una volta accertata l'infezione, la diffusione del battere negli organi *target*; accertare la correlazione tra infezione e presenza di lesioni e, infine, caratterizzare le alterazioni patologiche e compararle ai quadri morfologici tipici di PE del suino domestico.

6.2 Materiali e metodi

Durante la stagione di abbattimenti 2010-2011 sono stati campionati 38 soggetti, suddivisi per classe di età e sesso. Le classi di età sono 3 e comprendono soggetti tra gli 0 e 6 mesi (classe 1), tra 7 e 14 mesi (classe 2) e con età superiori a 14 mesi (classe 3) (Figure 2 e 3). In particolare sono stati campionati 9 soggetti di classe 1, 21 soggetti di classe 2 e 8 soggetti di classe 3. La suddivisione per sesso vede rappresentati 20 maschi e 18 femmine. In tabella 3 sono riassunti tutti i soggetti campionati, il loro numero identificativo e le caratteristiche di sesso ed età. Parte di questi soggetti sono rientrati nello studio su *Campylobacter* spp. e *Helicobacter* spp. gastrointestinali che verranno trattati nel capitolo successivo.

Essendo presenti diversi numeri identificativi per ogni soggetto campionato, per comodità in tabella è riportato un ID progressivo per ogni individuo. Questo numero ID sarà l'unico riferimento che verrà considerato nella trattazione del lavoro di tesi in questo e nei successivi capitoli. Il numero di soggetti su cui eseguire il campionamento è stato ricavato dalla formula $n = \ln(a)/\ln(q)$ (dove $a = 1$ - livello di

confidenza e $q = 1 - \text{prevalenza attesa}$) secondo Cannon & Roe (1982). Il numero di soggetti da campionare per ottenere almeno un campione positivo, su popolazione infinita con una confidenza del 99% e una prevalenza attesa di 29% (come riportato da Tomanová *et al.*, 2002) è di 14 animali. Durante il campionamento si è optato per un numero almeno doppio per ovviare ad eventuali problematiche di processazione.

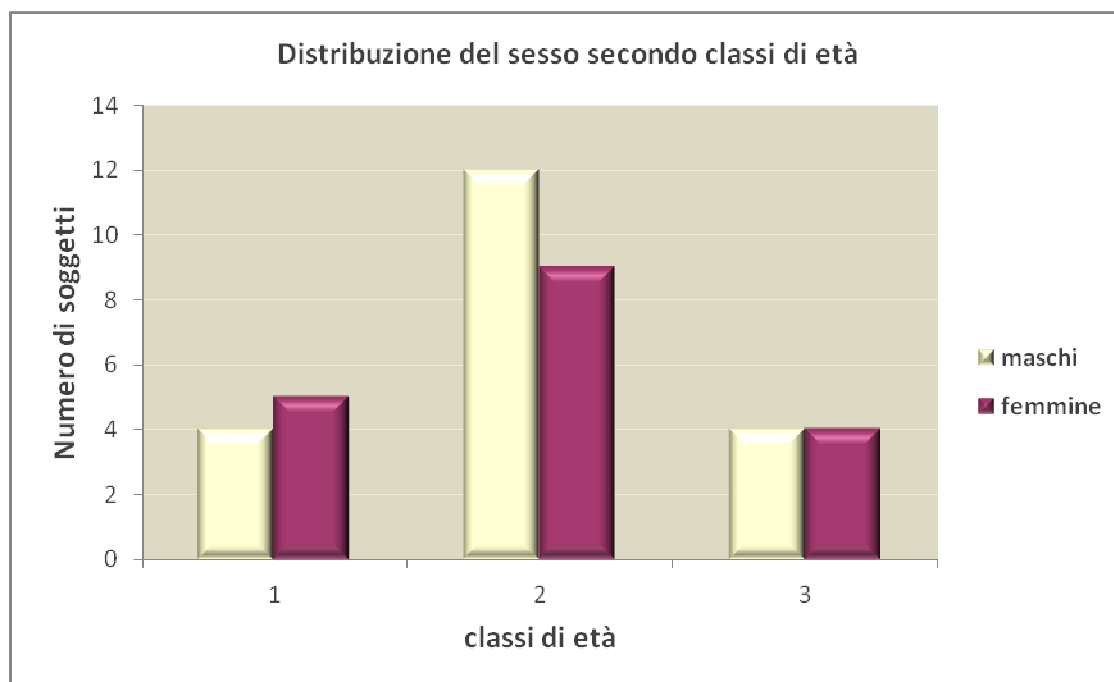


Figura 2: distribuzione del sesso della popolazione campionata secondo le tre classi di età.

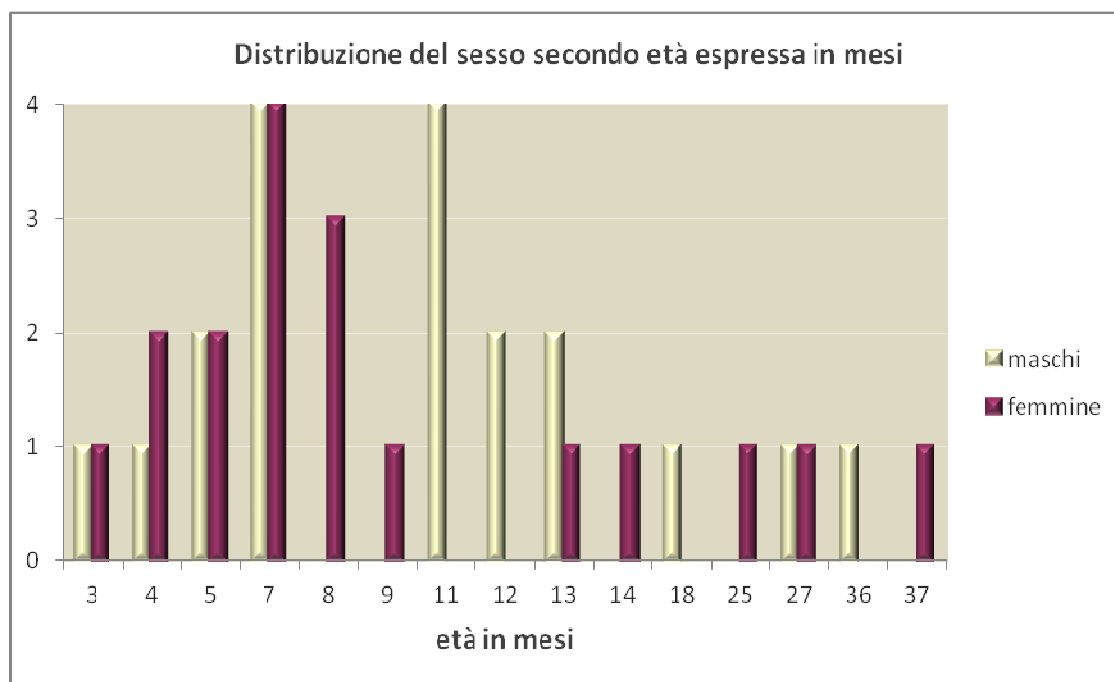


Figura 3: distribuzione dei soggetti secondo il sesso e l'età (in mesi).

Tabella 3: elenco dei soggetti campionati.

ID	IDENTIFICATIVO FASCETTA	REGISTRO BATTERIOLOGIA	REGISTRO ANATOMIA PATOLOGICA	ETÀ (mesi)	SESSO
1	2707	India 38/11a	AP130	25	F
2	2716	India 38/11b	AP131	7	M
3	2718	India 38/11c	AP132	7	M
4	2704	India 38/11d	AP133	7	F
5	2715	non eseguito	AP134	9	F
6	2850	India 44/11a	AP222	4	M
7	2852	India 44/11b	AP223	4	F
8	2853	India 44/11c	AP224	4	F
9	2851	India 44/11d	AP225	7	F
10	2925	India 44/11e	AP226	7	M
11	2728	India 58/11	AP261	11	M
12	1567	India 60/11	AP303	37	M
13	2702	India 63/11	AP316	11	M
14	2740	India 64/11	AP318	8	F
15	2721	India 68/11	AP334	13	F
16	2951	India 86/11	AP429	18	M
17	2747	India 102/11	AP488	13	M
18	2840	India 107/11	AP516	36	M
19	2730	India 139/11	AP672	14	F
20	34522	India 232/11a	AP1121	7	F
21	34506	India 232/11b	AP1122	7	M
22	34520	India 232/11c	AP1123	7	F
23	2741	non eseguito	AP320	8	F
24	2722	non eseguito	AP327	13	M
25	2667	non eseguito	AP328	12	M
26	2703	non eseguito	AP317	12	M
27	2709	non eseguito	AP144	27	F
28	2714	non eseguito	AP143	37	F
29	2710	non eseguito	AP155	11	M
30	2713	non eseguito	AP156	11	M
31	2744	non eseguito	AP319	8	F
32	2337	non eseguito	AP172	27	M
33	34514	non eseguito	AP1124	3	M
34	34510	non eseguito	AP1125	3	F
35	34524	non eseguito	AP1147	5	F
36	34523	non eseguito	AP1154	5	M
37	34533	non eseguito	AP1155	5	M
38	34468	non eseguito	AP1156	5	F

Per ogni preparato è stato eseguito il protocollo di immunoistochimica con anticorpo anti - *Lawsonia intracellularis* [fornito da DTU-VET (*Danmarks Tekniske Universitet*)], allestito secondo Boesen *et al.* (2005). Il protocollo di immunoistochimica è stato eseguito come segue: ogni sezione è stata sottoposta a deparaffinatura, idratazione progressiva e inibizione delle perossidasi endogene con 0,6% di tampone TRIS per 20 minuti. L'anticorpo primario, diluito 1:500 con PBS, è stato posto su ogni sezione fino a ricoprirne l'intera area e incubato a 4°C *over night*. In seguito sono stati usati un anticorpo secondario biotinilato e un terziario avidinato (Kit commerciale DAKO LSAB *Kit Peroxidase*) entrambi incubati per 15 minuti in camera umida previo risciacquo con tampone TRIS. La reazione è stata rilevata con cromogeno DAB (diamminobenzidina) per 10 minuti e contrasto nucleare con ematossilina-eosina. Ogni sezione ottenuta è stata osservata al microscopio ottico per la rilevazione di reazioni positive.

Per ogni preparato è stato eseguito il protocollo di immunoistochimica con anticorpo anti - *Lawsonia intracellularis* [fornito da DTU-VET (*Danmarks Tekniske Universitet*)], allestito secondo Boesen *et al.* (2005). Il protocollo di immunoistochimica è stato eseguito come segue: ogni sezione è stata sottoposta a deparaffinatura, idratazione progressiva e inibizione delle perossidasi endogene con 0,6% di tampone TRIS per 20 minuti. L'anticorpo primario, diluito 1:500 con PBS, è stato posto su ogni sezione fino a ricoprirne l'intera area e incubato a 4°C *over night*. In seguito sono stati usati un anticorpo secondario biotinilato e un terziario avidinato (Kit commerciale DAKO LSAB *Kit Peroxidase*) entrambi incubati per 15 minuti in camera umida previo risciacquo con tampone TRIS. La reazione è stata rilevata con cromogeno DAB (diamminobenzidina) per 10 minuti e contrasto nucleare con ematossilina-eosina. Ogni sezione ottenuta è stata osservata al microscopio ottico per la rilevazione di reazioni positive.



a

b

Figura 4: materiale usato per campionare i tessuti intestinali (a) e preparazione di un soggetto abbattuto per il sezionamento presso il Centro Visite Villa Torre (BO) (b).

6.3 Risultati e discussione

L'esame macroscopico delle porzioni intestinali non mostrava segni tipici di ileite proliferativa in nessun caso, anche se, talvolta, la parete ileale appariva ispessita, ma senza alterazioni superficiali o essudato macroscopicamente evidente. Nessun soggetto campionato mostrava sintomatologia o stato di nutrizione scadente, inoltre il contenuto rettale e intestinale non è mai apparso diarroico o emorragico. Da tutte le sezioni esaminate, prima in ematossilina-eosina, poi dopo colorazione immunoistochimica, non è stata evidenziata reazione positiva alla presenza di *Lawsonia intracellularis*, a fronte di controlli positivi reattivi. Questo risultato non ci ha permesso di approfondire molti degli obiettivi prefissati, ma abbiamo comunque potuto avanzare considerazioni sulle scelte adottate per condurre lo studio e sull'esito della prova.

Innanzitutto, queste precise porzioni intestinali e i linfonodi connessi sono stati identificati come organi *target* in base a quanto riportato in letteratura. Se, infatti, l'ileo negli ultimi 10 cm è la sede più frequentemente campionata (Jensen *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2010), è importante prelevare una porzione di colon, nel tratto spiroide, poiché nel suino in caso di negatività a livello ileale, il colon potrebbe comunque essere colonizzato da *Lawsonia intracellularis*. Questa evidenza è riportata nel 2,2% dei casi in uno studio condotto da Jensen *et al.* (2006). Inoltre, *Lawsonia intracellularis* è stata riscontrata anche nei linfonodi ileali, all'interno dei macrofagi, tramite PCR (Dezorzova-Tomanová *et al.*, 2006).

In secondo luogo, la prevalenza stimata nella popolazione deriva da una riesamina della bibliografia disponibile. Lo studio considerato è stato principalmente quello di Tomanová *et al.* (2002), dove la prevalenza nel cinghiale veniva stimata pari a 45,5% in Repubblica Ceca. Tra la bibliografia considerata era presente anche uno studio di prevalenza in cinghiali abbattuti in Svezia, in cui tutti i soggetti campionati sono risultati negativi alla ricerca del battere in campioni fecali (Jacobson *et al.*, 2005). La scelta di considerare la situazione di prevalenza della Repubblica Ceca e non della Svezia è nata dalla considerazione che la dinamica di popolazione del cinghiale italiano, così come la densità dei soggetti, potesse essere maggiormente sovrapponibile alla condizione centro-europea. Nel 2011, quando il campionamento per questo lavoro era già concluso, è stato pubblicato anche uno studio sulla prevalenza di *Lawsonia intracellularis* nel cinghiale in Germania. Gli autori, in questo caso, hanno ottenuto, tramite PCR su campioni di ileo e ostio ileale, una prevalenza del 20,6% nei soggetti abbattuti (Reiner *et al.*, 2011). Un dato interessante che emerge dal lavoro di Reiner *et al.* (2011) riguarda l'assenza di lesioni macroscopiche o sintomatologia riferibili a enterite proliferativa anche nei soggetti positivi alla presenza del battere. Questa condizione potrebbe essere determinata dal fatto che la PCR è in grado di individuare il DNA batterico sia che esso sia contenuto all'interno del tessuto intestinale dell'ospite, sia che si trovi libero nel contenuto fecale o sulla superficie dell'epitelio, non discriminando quindi tra presenza e infezione.

Per quanto concerne la metodica diagnostica adottata, ovvero l'IHC, ci hanno indirizzato verso questa preferenza alcune considerazioni: la necessità di adottare una tecnica che rilevasse la presenza del battere in associazione alle lesioni evidenziabili, ma con buona sensibilità e specificità. Sensibilità e specificità non sono elevate nelle colorazioni ematossilina-eosina e *Warthin- Starry*, ma la prima è stata comunque svolta per ottenere un buon dettaglio delle alterazioni morfologiche cellulari. La PCR su tessuto, nonostante presenti sensibilità più elevata rispetto all'immunoistochimica, consta anche di alcuni difetti, come l'inibizione fecale, osservata anche nello studio svolto in Svezia (Jacobson *et al.*, 2005), la ridotta specificità dovuta alla presenza di falsi positivi (evidenziata da Ladinig *et al.*, 2009) siano essi legati a contaminazioni durante l'allestimento, oppure alla rilevazione campioni positivi per la sola presenza di DNA batterico in assenza d'infezione. Un'altra metodica diagnostica considerata è l'ibridazione in situ (ISH): anch'essa permette di valutare la presenza del battere su sezione istologica, in associazione o meno a lesioni microscopiche, ma presenta ridotta sensibilità rispetto all'IHC. Secondo Ladinig *et al.* (2009) questa differenza tra IHC e ISH sarebbe dovuta alla maggior instabilità del *target* dell'ISH che risulta degradarsi maggiormente a seguito della fagocitosi, per questo motivo tra le due metodiche è consigliato l'uso dell'IHC, che si presenta anche meno laboriosa. Infine, la scelta del mezzo diagnostico è stata convogliata verso l'IHC anche perché, come riportato da (Jacobson *et al.*, 2010), questa tecnica è considerata *gold standard* per la diagnosi d'infezione se si ha disponibilità di tessuto (*post mortem*). Altre metodiche, basate sulla sierologia, come l'ELISA o l'immunofluorescenza indiretta, presentano elevati valori di sensibilità, ma hanno come *target* la presenza di anticorpi contenuti nel siero e comunicano solo l'avvenuto contatto tra ospite e patogeno, ma non la presenza d'infezione (Guedes *et al.*, 2002). Questi fattori hanno spinto la scelta della tecnica diagnostica di rilevazione verso l'immunoistochimica, poiché il fine del presente lavoro era quello di identificare, in soggetti selvatici infetti, la presenza/assenza di lesioni tipiche e comparare le stesse con quelle osservabili nel suino, in modo da comprendere la dinamica del battere all'interno di una popolazione selvatica, sottoposta a fattori ambientali, di densità e di stato immunitario differenti rispetto al consueto suino domestico.

A dispetto dell'accortezza nella selezione del campione e della tecnica diagnostica, in questo studio non è stato possibile ottenere campioni positivi su cui applicare i criteri di valutazione istopatologici. Questo potrebbe essere dovuto alla ridotta prevalenza del battere nella popolazione, differente rispetto a quella attesa dalla disamina della bibliografia e più simile alla condizione rilevata in Svezia da Jacobson *et al.* (2005). In previsione di ulteriori campionamenti attuati ad approfondire questo lavoro sarebbe opportuno, al fine di ottenere risultati più soddisfacenti, operare previo *screening* sierologico della popolazione, identificando la sieroprevalenza effettiva di *Lawsonia intracellularis* nella popolazione campionabile e individuando, con maggior precisione, le classi di età più soggette alla presenza del battere, in modo

da effettuare un campionamento mirato a indicare, con minor margine di errore, la popolazione potenzialmente infetta. Eventualmente sarebbe possibile associare alla diagnosi immunoistochimica la PCR diretta su tessuto, per poter conferire maggiore sensibilità alla procedura diagnostica.

Capitolo 7

HELICOBACTER spp. e CAMPYLOBACTER spp. GASTROENTERICI: RICERCHE CONDOTTE IN UNA METAPOPOLAZIONE DI CINGHIALI

7.1. Introduzione

Parte dei soggetti prelevati per lo studio d'infezione da *Lawsonia intracellularis* sono stati campionati per indagini finalizzate all'isolamento, o al rilevamento mediante indagini biomolecolari, di *Helicobacter* spp. e *Campylobacter* spp. da mucosa gastrica e contenuto ciecale.

Anche per questi batteri, le segnalazioni bibliografiche che trattano il cinghiale selvatico sono scarse, con una sola identificazione di *Helicobacter* spp. gastrico in un soggetto in Polonia (Fabisiak *et al.*, 2010) e con identificazione di *Campylobacter jejuni* e *C. coli* in alcuni cinghiali in Svezia (Wahlström *et al.*, 2003), mentre studi condotti in Svizzera non hanno identificato alcun battere riferibile a *Campylobacter* spp. in feci di cinghiali selvatici (Wacheck *et al.*, 2010). Di questi lavori solo nello studio condotto da Fabisiak *et al.* (2010) è stata indagata la presenza di lesioni anatomo-istopatologiche nella mucosa gastrica, senza tuttavia notare particolari differenze tra il soggetto positivo e gli altri 16 campionati.

Poco si conosce, dunque, sulla presenza e sul ruolo patogeno di questi microrganismi nel cinghiale. A tal proposito questo studio si prefigge lo scopo di indagare la presenza di microrganismi dei generi *Helicobacter* spp. e *Campylobacter* spp. in questa specie animale, cercando poi di osservare, in preparati istologici ottenuti da stomaco e intestino, manifestazioni istopatologiche correlabili alla presenza degli stessi.

7.2 Materiali e metodi

Per questo studio sono stati campionati 21 soggetti, identificati in tabella 3 (Capitolo 6) con ID da 1 a 4 e da 6 a 22. La distribuzione di sesso ed età, in questa casistica, è indicata dalla Figura 5. In particolare sono presenti 11 maschi e 10 femmine, con 3 soggetti di classe 1 (0-6 mesi), 14 di classe 2 (7-14 mesi) e 4 di classe 3 (> 14 mesi).

Per ogni animale sono stati prelevati, dopo legatura a livello di *cardia*, caudalmente al piloro e dell'ampolla anale, stomaco e intestino, come riportato a pagina 45. Una volta trasportati presso il Servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie di Bologna (DIMEVET), i due tratti gastroenterici sono stati divisi e campionati separatamente, avendo cura di non contaminare i campioni.

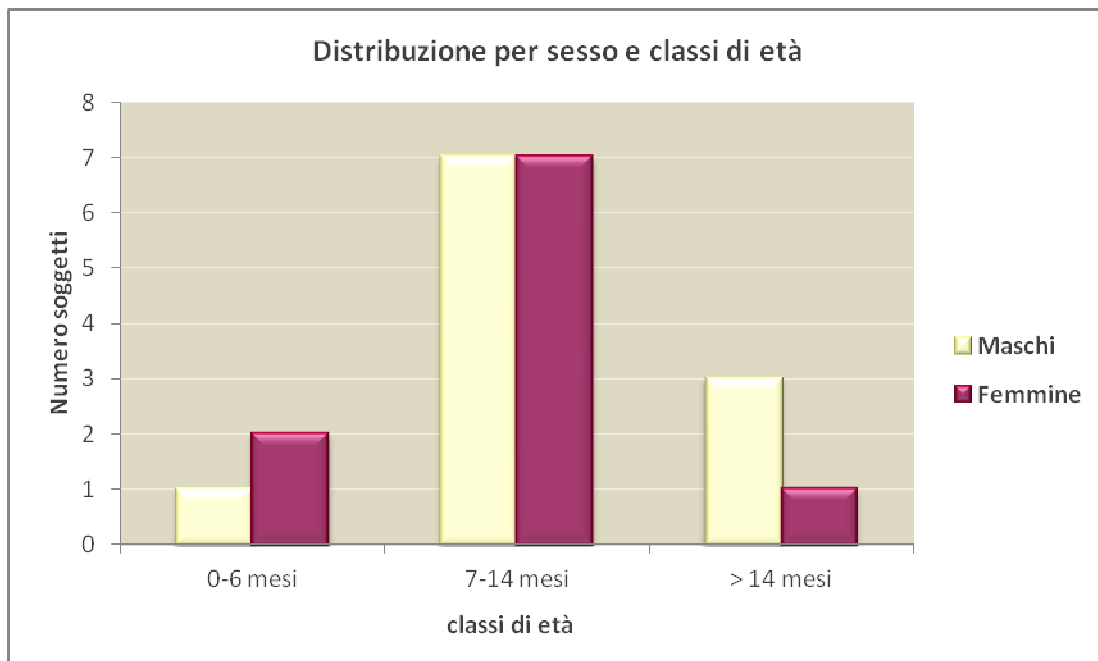


Figura 5: distribuzione di sesso e classi di età dei soggetti campionati.

7.2.1 CAMPIONAMENTO DI STOMACO PER INDAGINI MICROBIOLOGICHE, BIOMOLECOLARI E ISTOLOGICHE

Lo stomaco è stato aperto lungo la grande curvatura e il contenuto è stato delicatamente allontanato. Una volta esposta la mucosa ne è stato osservato l'aspetto macroscopico in cerca di lesioni evidenti. La superficie è stata poi irrigata delicatamente con acqua distillata sterile per allontanare piccole porzioni di alimento ancora presenti, successivamente l'organo è stato diviso in due metà simmetriche lungo la piccola curvatura.

- Da una prima metà è stata raschiata la superficie mucosa, in tutta la sua estensione, con una lama da bisturi sterile, e il materiale asportato è stato conservato in contenitori sterili. Il materiale campionato è stato immediatamente conferito al Laboratorio di Batteriologia del DIMEVET e processato.
- Dalla seconda parte di stomaco sono stati prelevati, a tutto spessore, due campioni di circa 2x2 cm l'uno: il primo a livello di regione antrale e il secondo nella regione del corpo, dove si osserva mucosa gastrica propriamente detta. Metà di ogni campione è stata conservata in formalina tamponata al 10%, l'altra metà è stata congelata a temperatura - 80°C per indagini biomolecolari. Il prelievo è stato eseguito avendo cura di non contaminare i campioni. La restante porzione di organo è stata conferita immediatamente al Laboratorio di Batteriologia del DIMEVET per l'isolamento di *Helicobacter suis*.

7.2.2 CAMPIONAMENTO DELL'INTESTINO PER INDAGINI BATTERIOLOGICHE E ISTOLOGICHE

Dall'intestino sono stati prelevati, per le indagini batteriologiche, circa 20 g di contenuto ciecale, mentre per le valutazioni anatomo-patologiche sono state fissate

porzioni di ileo, cieco e colon. Il contenuto ciecale è stato prelevato dopo apertura dell'apice del cieco e posto in provette sterili immediatamente conferite al Laboratorio di Batteriologia del DIMEVET. Per il campionamento delle sezioni di intestino per le indagini istologiche si rimanda alla sezione riguardante il campionamento per indagine su *Lawsonia intracellularis*, Capitolo 6.

7.2.3 PROCEDURE D'ISOLAMENTO DI *HELICOBACTER* SPP. E *CAMPYLOBACTER* SPP.

Il materiale prelevato da stomaco ed intestino può essere contaminato da numerose specie batteriche. Per ottenere l'isolamento dei microrganismi di interesse è necessario procedere, quindi, tramite l'impiego di terreni selettivi, ovvero terreni in grado di inibire la crescita di batteri indesiderati. Per l'isolamento di *Campylobacter* spp. e *Helicobacter* spp. da campioni policontaminati si utilizzano terreni selettivi di Skirrow (1977) e Blaser (Blaser *et al.*, 1979; On *et al.*, 2005). Il supplemento di Skirrow (SK) è composto da vancomicina, trimethoprim, polimixina B e anfotericina B, mentre quello di Blaser (BL) contiene gli stessi antibiotici con l'aggiunta di cefalotina. Utilizzando terreni non selettivi, invece, si riduce la contaminazione da polimicrosismo mediante membrane filtranti che favoriscono l'isolamento di microrganismi mobili. La sequenza procedurale che è stata seguita è riportata in Figura 6.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Per procedere all'isolamento i campioni prelevati sono stati trattati come segue:

- **Mucosa gastrica:** parte del raschiato da mucosa è stato diluito in concentrazioni 1:2 con Nutrient Broth (Oxoid) all'interno di provette contenenti palline di vetro sterile. Le provette sono state poste in agitazione continua per favorire la liberazione dei microrganismi dal muco gastrico. Una parte dell'organo è stata trattata con acidificazione per isolamento di *Helicobacter suis*, come riportato da Baele *et al.* (2008).
- **Contenuto ciecale:** 5 g di campione sono stati diluiti in 5 ml di soluzione fisiologica sterile e posti in agitazione.

SEMINA DEGLI INOCULI

Una volta preparati i campioni si è proceduto alla semina, che è stata condotta seguendo due modalità: semina su terreni selettivi e semina su terreni non selettivi con tecnica della membrana filtrante.

- **Semina su terreni selettivi:** 10 µl di ogni campione sono stati seminati in doppio su terreni selettivi di Skirrow (Oxoid), Blaser-Wang (Oxoid) e *Campylobacter blood-free selective agar* (mCCDA, Oxoid). I primi due terreni sono stati preparati usando Nutrient Broth n°2 (Oxoid) con 1,5% di Bacto Agar (Difco) di terreno base.
- **Semina mediante tecnica della membrana filtrante:** 200 µl di campione sono stati diluiti in 300 µl di diluente sterile composto da 25 ml di Bacto-Brain Heart Infusion (BD- Becton Dickinson), 75 ml di siero equino inattivato e 7,5 g di

glucosio (SIGMA). Il composto è stato, poi, omogeneizzando su vortex per circa 30 secondi. Nel frattempo è stata depositata una membrana filtrante sterile di acetato di cellulosa di diametro 47 mm e porosità 0,65 μm (DAWP04700, Millipore Corporation, Bedford, MA 01730 USA) sulla superficie di una piastra di *Nutrient Agar* 10% preparato come descritto precedentemente. In seguito, al centro della membrana, sono stati depositati 400 μl del preparato, distribuito poi su tutta la superficie della membrana, avendo cura di non superare i bordi. Dopo incubazione delle piastre in microaerofilia a $37\pm 1^\circ\text{C}$ per un'ora (senza girarle), la membrana è stata rimossa con pinze sterili e il liquido filtrato è stato seminato su tutta la superficie della piastra, di seguito reincubata.

INCUBAZIONE, TRAPIANTO E CONSERVAZIONE

In entrambi i casi, le colonie ascrivibili a *Helicobacter* spp. e *Campylobacter* spp. sono state trapiantate su Brucella Agar addizionato al 10% di sangue ovino. Una volta clonati, dai ceppi veniva estratto il DNA e gli estratti venivano conservati a -20°C . I ceppi erano poi congelati a -80°C in *Triptycase Soy Broth* (BD) addizionato del 10% di glicerolo in attesa di identificazione genotipica e fenotipica.

ISOLAMENTO DI *HELICOBACTER SUIS* DA MUCOSA GASTRICA:

Data la difficoltà d'isolamento di questo microrganismo, dovuta alle sue peculiarità metaboliche, per questa procedura è stato seguito quanto descritto da Baele *et al.* (2008). Per questo la metà di stomaco prelevata su cui non è stato eseguito il raschiato, è stata acidificata in una soluzione al 1% di acido cloridrico (HCl) per circa 1 ora. Una volta acidificato, il muco è stato disciolto in una miscela composta da Brucella Broth addizionata al 20% con siero fetale bovino e poi seminata su piastre di Brucella Agar (Oxoid), preparate come di seguito:

- 20% (v/v) siero fetale bovino (SIGMA)
- 5 mg l di anfotericina B (Fluka)
- Supplemento selettivo di Skirrow (Oxoid)
- supplemento Vitox (Oxoid)
- 0,1 % di carbone attivo batteriologico (MERCK)
- HCl in quantità sufficiente a ottenere un pH finale pari a 5

Una volta seminate le piastre sono state incubate, senza girarle, a $37\pm 1^\circ\text{C}$ e in microaerofilia. Le piastre sono state controllate ogni 48 ore per individuare la crescita di microrganismi riferibili a *Helicobacter suis* e, in quest'occasione, veniva aggiunta una piccola aliquota di Brucella Broth, addizionato con 20% di siero fetale bovino, sulla superficie, per evitare la disidratazione del terreno.

7.2.4 IDENTIFICAZIONE BIOMOLECOLARE DEGLI ISOLATI

Tutti gli isolati clonati sono stati sottoposti a procedura di estrazione del DNA come da protocollo n° 2 in allegato al presente capitolo.

Il DNA estratto è stato sottoposto alle PCR di genere *Campylobacter* spp. ed *Helicobacter* spp. come da protocolli n° 3 e n° 5 in allegato.

La sequenza delle fasi d'identificazione genotipica è riportata in Figura 7.

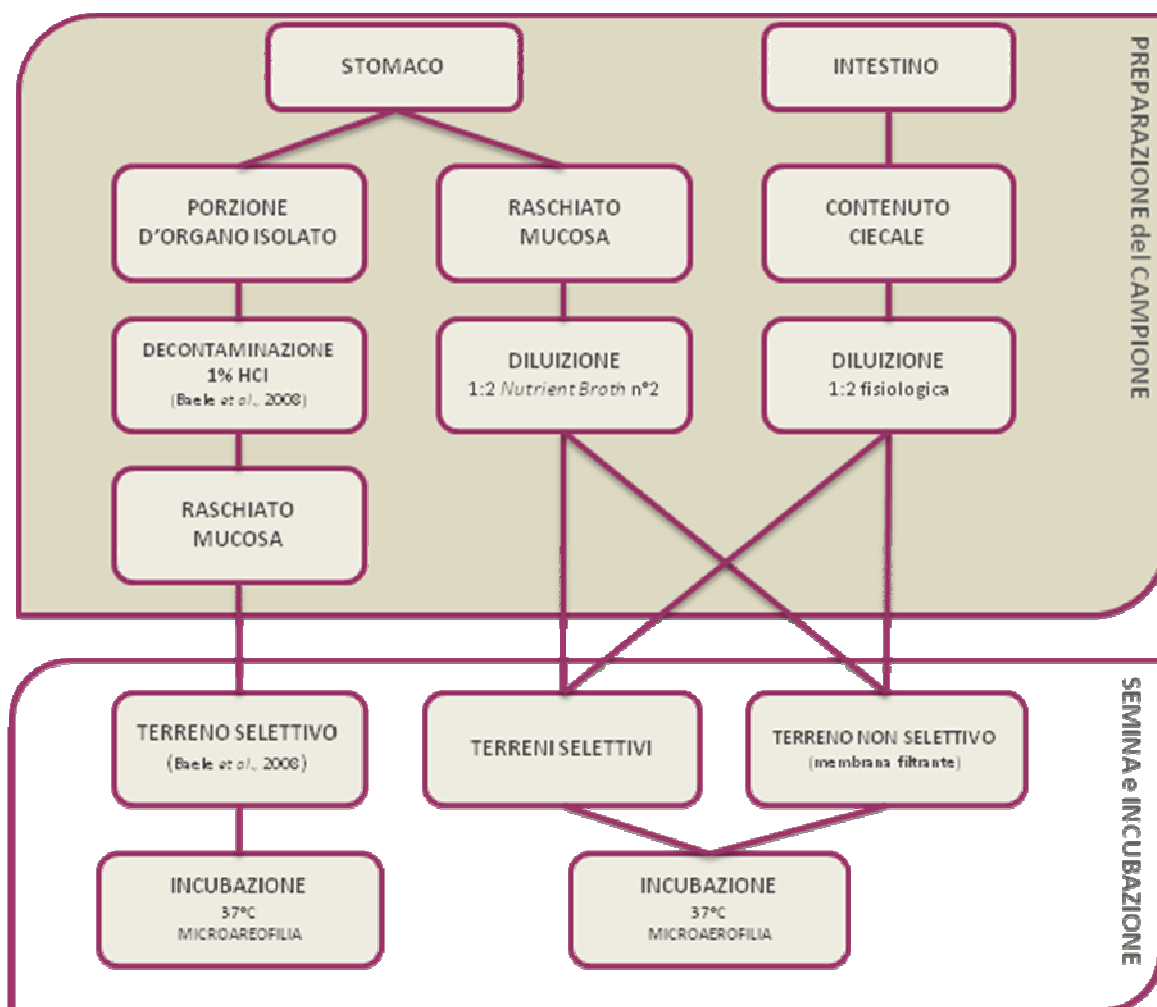


Figura 6 : schema delle diverse procedure utilizzate per l'isolamento di *Helicobacter* spp. e *Campylobacter* spp. da mucosa gastrica e contenuto ciecale.

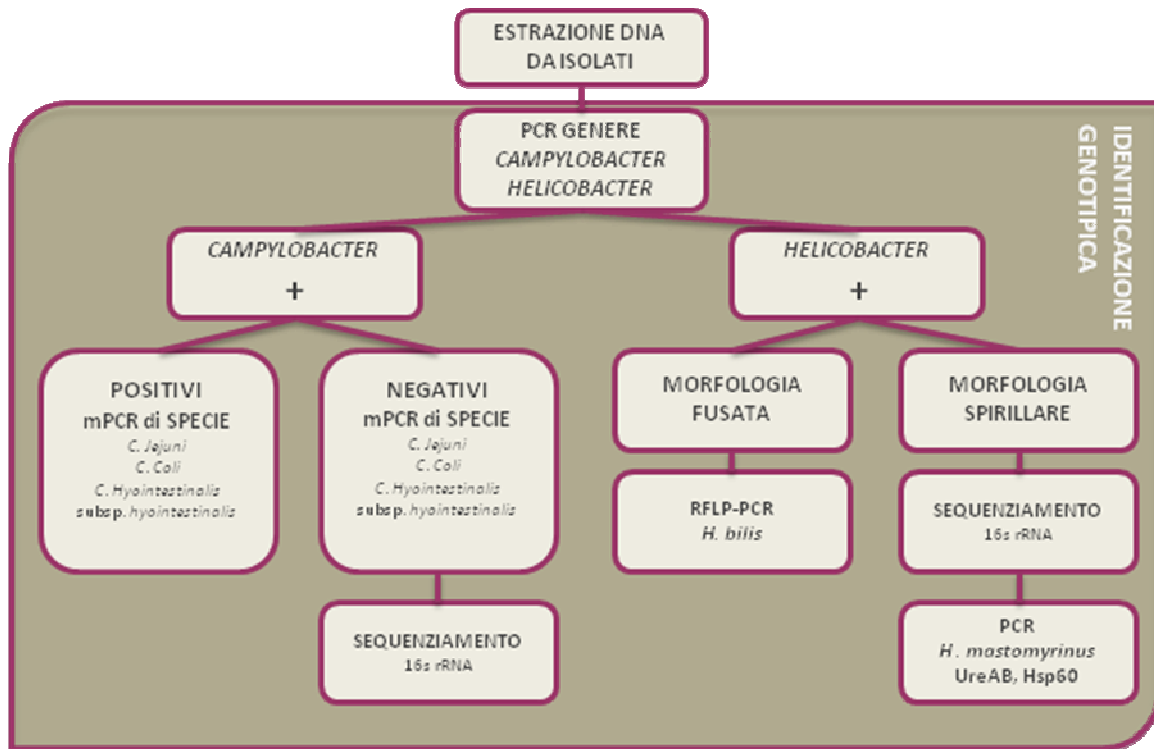


Figura 7: rappresentazione schematica del procedimento d'identificazione genotipica.

CAMPIONI POSITIVI A PCR PER GENERE *CAMPYLOBACTER* SPP.

I campioni positivi al genere *Campylobacter* sono stati testati con Multiplex-PCR (m-PCR) per specie *C. jejuni*, *C. coli* e *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* come da protocollo n° 4 in allegato. I campioni negativi a m-PCR sono stati sottoposti a PCR per amplificare una porzione del gene 16s rRNA (protocollo n° 7 in allegato) da sottoporre a sequenziamento. Dall'analisi delle sequenze, i cloni identificati come *Campylobacter lanienae* sono stati sottoposti a Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) secondo il protocollo descritto da Michaud *et al.* (2001) per *Campylobacter jejuni*, usando l'endonucelasi *SmaI* (Fermentas – *life science*). I frammenti, dopo digestione enzimatica, sono stati separati tramite elettroforesi in CMA (*Certified Megabase Agarose* – Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) impostando il *Chef Mapper XA* (Bio-Rad) con le seguenti condizioni di corsa: Two state, Gradiente 5 V/cm, Tempo 22,5 ore, Angolo 120°, Initial Switch time 0,5"; Final switch time 40"; Rampin factor:0.

I profili PFGE, dopo acquisizione dell'immagine del gel colorato con Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium), come da indicazioni della ditta produttrice, per 60 minuti in agitazione, sono stati analizzati con il *software* di analisi dei cluster Bionumerics (Bionumerics, Applied Maths, Keistraat, Belgium) utilizzando l'indice di similarità DICE e il dendrogramma è stato costruito con il metodo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Le valutazioni sono state svolte impostando i valori di similarità > 90%.

CAMPIONI POSITIVI A PCR DI GENERE *HELICOBACTER* SPP.

I microrganismi positivi alla PCR di genere *Helicobacter* spp. con morfologia microscopica fusata, riferibili a "*Flexispira rappini*", sono stati sottoposti a RFLP-PCR (*Restriction fragment lenght polymorphism* – PCR) come da protocollo n° 6 in allegato. I restanti sono stati sottoposti a PCR per amplificare una porzione del gene 16s rRNA specifica di *Helicobacter* spp., come da protocollo n° 8 in allegato.

ANALISI DELLE SEQUENZE

Tutte le sequenze sono state realizzate dal Servizio di Sequenziamento PRIMM (Milano, Italia) con l'analizzatore ABI3730DNA. Le sequenze risultate sono state analizzate tramite MEGA5.05 (Tamura *et al.*, 2011) e comparate con quelle depositate del gene 16s rRNA utilizzando BLAST. Dallo studio genotipico non è stato possibile identificare inequivocabilmente numerosi cloni di genere *Helicobacter* spp., per cui si è provveduto ad eseguire PCR per l'amplificazione dei geni *UreAB* (protocollo n° 11) e *Hsp60* (protocollo n° 12) e PCR di specie per *Helicobacter mastomyrinus* (protocollo n° 9).

7.2.5 ANALISI FILOGENETICA

Le sequenze ottenute dall'amplificazione del gene 16s rRNA, dopo allineamento con algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) insieme a sequenze di riferimento ottenute da GeneBank (i codici di riferimento delle sequenze sono riportati in Figura 8, 9 e 10), sono state sottoposte ad analisi filogenetica. La scelta del modello migliore di sostituzione nucleotidica (K80+ Γ +I), gli alberi filogenetici *Minimun Evolution* (ME) e *Maximum Likelihood* (ML), entrambi con 500 repliche di *bootstrap*, sono stati ottenuti con MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). L'analisi *Bayesian Inference* (BI) è stata svolta con MrBayes 3.2 (Ronquist *et al.*, 2011): il processo Markov Chain Monte Carlo è stato programmato per eseguire due corse indipendenti ciascuna per 1.000.000 di generazioni, con campionamento di un albero ogni 100 generazioni, per un totale di 10001 alberi. Il *burnin* è stato impostato al 10%.

7.2.6 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DI *HELICOBACTER* SPP. ISOLATI E NON IDENTIFICATI GENOTIPICAMENTE.

La mancata identificazione a livello di specie, a fronte dell'elevata omologia genotipica dei cloni testati, ci ha condotti a selezionare alcuni isolati, rappresentando tutti i soggetti positivi, per sottoporli a indagine fenotipica nell'ottica di un approccio polifasico. La scelta dei *test* da utilizzare ha seguito le indicazioni di Dewhirst *et al.* (2000) mentre le metodiche di preparazione e conduzione degli stessi sono state estrapolate da quanto riportato da On & Holmes (1991a).

A ogni clone è stato assegnato un identificativo alfabetico da A a T. Sono state condotte, quindi, prove di crescita, biochimiche e di sensibilità. Inoltre, la morfologia è stata descritta dopo osservazione di preparati al microscopio ottico ed elettronico.

PROVE DI CRESCITA:

Il punto critico di queste prove è nella titolazione degli inoculi, come suggerito da On & Holmes (1991b). La disomogeneità degli inoculi, infatti, provocherebbe la comparsa di falsi positivi dovuti all'eccesso di batteri nella sospensione, o falsi negativi qualora i microrganismi siano insufficienti. I tre terreni usati per queste prove sono stati preparati come segue:

- Nutrient Agar 5% (NA 5%): terreno base Nutrient Broth n°2 (Oxoid) + 1,5% Agar + 5% sangue defibrinato ovino
- Glicina 1%: NA 5% + 1% glicina (SIGMA) (On & Holmes, 1991a)
- Bile 1%: NA 5% + 1% Bile bovina (SIGMA) (On & Holmes, 1991a)

L'inoculo è stato titolato preparando una sospensione batterica di opacità pari al valore 0,5 della scala di McFarland ($\sim 10^8$ u.f.c./ml) in Nutrient Broth N°2 (Oxoid) da colture fresche su NA 5%. La sospensione è stata poi diluita 1:100, sempre in Nutrient broth N°2 (Oxoid), per ottenere una concentrazione finale di $\sim 10^6$ u.f.c./ml. La corretta titolazione delle diluizioni veniva confermata tramite conta su piastra. Infine, 20 µl di queste sospensioni sono stati inoculati in doppio a spot su piastre di:

- NA 5% incubata a 37°C in microaerofilia
- NA 5% incubata a 42°C in microaerofilia
- NA 5% incubata a 37°C in anaerobiosi
- NA 5% + 1% glicina incubata a 37°C in microaerofilia
- NA 5% + 1% bile incubata a 37°C in microaerofilia

Su ogni piastra è stato seminato un numero pari o inferiore a 4 ceppi (o relativi controlli). Il diametro dei singoli inoculi era di circa 1 cm. L'anaerobiosi è stata ottenuta con il Kit commerciale Gasenerating Kit- H_2/CO_2 (Oxoid) e la lettura è stata eseguita dopo 72 ore di incubazione. I controlli sono riportati in tabella 4.

PROVE BIOCHIMICHE

Le prove biochimiche consentono di evidenziare la produzione di alcuni enzimi da parte dei batteri testati: ossidasi, catalasi, esterasi (in grado d'idrolizzare l'indoxyl-acetato), fosfatasi alcalina (che catalizza l'idrolisi di esteri fosforici in presenza di magnesio e ambiente basico), γ -glutamyltrasferasi (che catalizza il trasferimento di un gruppo γ -glutamile da un γ -glutamile-peptide ad un altro peptide o aminoacido), ureasi (che idrolizza l'urea liberando ammoniaca) e nitratoriduttasi (che riduce nitrati a nitriti). La combinazione della produzione di diversi enzimi viene comunemente utilizzata per identificare diverse specie batteriche. I controlli di qualità utilizzati nelle prove sono riassunti in tabella 4.

1) OSSIDASI

Su una piastra Petri di vetro è stata disposta una striscia di carta bibula imbibita con alcune gocce di una soluzione al 1% (p/v) di tetrametil-p-fenilendiamina dicloridrato precedentemente preparata e aliquotata. Con un'ansa sterile di plastica monouso è stata prelevata della patina batterica che è stata saggiata sulla carta bibula imbevuta del reattivo. Dopo aver atteso 20 secondi dall'allestimento della prova, la

comparsa di una colorazione viola scuro indicava una **reazione positiva**, quindi la produzione di enzima.

2) CATALASI

All'interno di provette di vetro sono stati posti 2 ml di una soluzione al 3% di perossido di idrogeno in acqua deionizzata. Da ogni coltura dei ceppi testati, e dei relativi controlli, è stata prelevata un'ansata di patina batterica che è stata saggiata nella soluzione allestita. La comparsa immediata di bolle di ossigeno all'interno della soluzione era indice di **reazione positiva**, mentre l'assenza di bolle, o la comparsa delle stesse solo dopo 20-30 secondi dall'immersione, era indice di **reazione negativa**.

3) IDROLISI dell'INDOXYL-ACETATO

Sono stati preparati dischetti di nitrocellulosa di 6 mm di diametro imbevuti con 25 µl di una soluzione al 10% (p/v) di indoxyl-acetato e acetone. Da una coltura fresca ottenuta su NA 5% è stata prelevata un'ansata abbondante di patina batterica che è stata scaricata sul dischetto, successivamente inumidito con una goccia di acqua deionizzata sterile. La prova è stata considerata **positiva** con il viraggio di colore del dischetto virava verso il blu-scuro o blu-verde.

4) FOSFATASI ALCALINA (PAL)

Per ottenere il *buffer* di reazione finale è stato necessario preparare due soluzioni base: la **soluzione 1** (0,1 mol/l di Glicina-NaCl), preparata sciogliendo 0,75 g di glicina e 0,585 g di NaCl in 100 ml di acqua deionizzata, e la **soluzione 2**, ottenuta sciogliendo in 100 ml di acqua deionizzata 0,4 g di NaOH. Da queste due soluzioni è stato preparato un *buffer* intermedio, chiamato **glicine buffer** (0,002M MgCl₂), composto da 87,6 ml di soluzione 1 e 12,4 ml di soluzione 2, a cui sono stati aggiunti 0,04 g di cloruro di magnesio esaidrato (MgCl₂ - 6H₂O). Il *glicine buffer* è stato poi corretto per raggiungere pH 9±0,2. Aggiungendo 0,04g di 4-NPP in 10 ml di *glicine buffer* e sciogliendo su piastra riscaldata a 50°C, è stato ottenuto, infine, il **buffer di reazione**. Dopo aver preparato una sospensione in acqua deionizzata con opacità pari o superiore al grado 9 della scala McFarland di patina batterica degli isolati da testare e dei relativi controlli, sono stati prelevati 100 µl della sospensione stessa e sono stati posti in pozzetti di una piastra *micro-titre* precedentemente riempiti con 100 µl di *buffer* di reazione.

In seguito a incubazione per 1 ora a 35°C, lo sviluppo di una colorazione gialla intensa indicava una **reazione positiva**, mentre una colorazione gialla debole era indice di **reazione positiva debole**.

5) Γ-GLUTAMILTRANSFERASI (GGT)

Per l'esecuzione di questa prova sono stati preparati due reattivi: una soluzione 0,1 M di Gly-Gly in 0,1 M di TRIS a pH 8,5 (**reattivo 1**) e una soluzione 29 M di L-glutamic acid-γ-(p-nitroanilide) hydrochloride (**reattivo 2**) in reattivo 1.

Si è proceduto a riempire i pozzetti di una piastra *micro-titre* con 90 µl di **reattivo 1** e 10 µl di **reattivo 2**, avendo cura di ri-sospendere il reattivo 2 su piastra elettrica.

Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di sospensione batterica con opacità pari o superiore a 9 della scala di McFarland. Le piastre sono state incubate a 35°C per un'ora. Un viraggio di colore verso il giallo era considerato esito **positivo**.

6) UREA

Sono stati sciolti 2,9 g di Urea Agar Base (BBL) in 100 ml di acqua deionizzata sterile. La soluzione ottenuta, denominata **urea di Christensen** è stata filtrata con filtri da batteriologia 0,22 µm e posta a 5°C±3.

Dopo aver preparato una sospensione in acqua deionizzata con opacità pari o superiore al grado 9 della scala McFarland con patina batterica degli isolati da testare e dei relativi controlli, sono stati prelevati 100 µl della sospensione stessa (~ 10⁸ u.f.c.) e sono stati posti in provette contenenti 100 µl di urea di Christensen. In seguito a incubazione per 6 ore a 35°C, lo sviluppo di una colorazione fucsia indicava una **reazione positiva**, mentre una colorazione giallo-arancio debole era indice di **reazione negativa**.

7) RIDUZIONE dei NITRATI

Sono state preparate piastre Petri contenenti un terreno al 1% di nitrato di potassio su base di Nutrient Agar addizionato al 6% di sangue ovino defibrinato. Per ogni ceppo e per i relativi controlli, è stata seminata in ogni piastra un'area di circa 2 cm di diametro con un'ansata abbondante di patina batterica. La superficie del terreno è stata poi tagliata, con un'ansa sterile, lungo la semina. In seguito a incubazione per 24-48 ore in microaerofilia la colorazione del terreno virava, attorno alla zona di semina, al grigio-marrone scuro, indicando una **reazione positiva**. Al contrario l'assenza di questa colorazione, in presenza di crescita di microrganismi sulla piastra, era indice di **reazione negativa**.

PROVE DI SENSIBILITÀ ALLA CEFALOTINA E ALL'ACIDO NALIDIXICO

Per questi *test* è stata allestita una sospensione batterica con opacità pari al valore 0,5 della scala di McFarland (~ 10⁸ u.f.c./ml) per ogni ceppo testato e i relativi controlli. Nella sospensione allestita è stato imbibito un tampone sterile con cui è stata seminata omogeneamente la superficie di piastre di Nutrient Agar 5%. Dopo qualche minuto sono stati posti sulla superficie del terreno due dischetti, uno di acido nalidixico da 30µg (BBL) e uno di cefalotina da 30µg (BBL). Le piastre sono state poi incubate a 37°C in microaerofilia per 48 ore. Sono stati considerati **sensibili** i ceppi batterici con aloni di inibizione, indipendentemente dal diametro, mentre venivano considerati **resistenti** i ceppi in cui l'alone era assente (Ursing *et al.*, 1994).

MICROSCOPIA ELETTRONICA

La prova è stata condotta presso la sede di Padova dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Le caratteristiche morfologiche sono state osservate tramite microscopio elettronico a trasmissione (TEM Philips EM208 S). I preparati osservati sono stati allestiti da colture di 48 ore con colorazione negativa al 2% di acido fosfotungstico in acqua distillata.

7.2.7 INDAGINE BIOMOLECOLARE PER RICERCA DI *HELICOBACTER* SPP. E *CAMPYLOBACTER* SPP. DA PORZIONI DI MUCOSA GASTRICA

Le porzioni di mucosa prelevate durante il campionamento e stoccate a – 80°C sono state sottoposte a estrazione di DNA da tessuto seguendo il protocollo n° 1 in allegato al capitolo. Gli estratti ottenuti sono stati indagati con PCR di genere *Helicobacter* spp. e *Campylobacter* spp. come da protocolli n° 5 e n° 3 in allegato.

Tabella 4: ceppi utilizzati nel controllo qualità durante l'esecuzione delle prove biochimiche.

	CONTROLLO POSITIVO	CONTROLLO NEGATIVO
PROVE di CRESCITA		
37°C microaerofilia	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 29428	<i>Non necessario</i>
37°C anaerobiosi	<i>Helicobacter pullorum</i> CIP 104787	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 29428
42°C microaerofilia	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 29428	<i>Campylobacter fetus subsp. venerealis</i> ATCC 19438
1% glicina	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 29428	<i>Helicobacter muridarum</i> ATCC 49282
1% bile	<i>Helicobacter canis</i> ATCC 51401	<i>Helicobacter muridarum</i> ATCC 49282
PROVE BIOCHIMICHE		
Ossidasi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Catalasi	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
Idrolisi indoxyl-acetato	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 29428	<i>C fetus subsp. venerealis</i> ATCC 19438
PAL	<i>Helicobacter canis</i> ATCC 51401	<i>Helicobacter pullorum</i> CIP 104787
GGT	<i>Helicobacter canis</i> ATCC 51401	<i>Helicobacter fennelliae</i> CIP 103758
UREA	<i>Helicobacter muridarum</i> ATCC 49282	<i>Helicobacter canis</i> ATCC 51401
Riduzione dei nitrati	<i>Helicobacter pullorum</i> CIP 104787	<i>Helicobacter canis</i> ATCC 51401
PROVE di SENSIBILITÀ		
Acido nalidixico	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 29428	<i>Campylobacter fetus subsp. venerealis</i> ATCC 19438
Cefalotina	<i>Campylobacter fetus subsp. venerealis</i> ATCC 19438	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 29428

7.2.8 VALUTAZIONE ISTOLOGICA DI STOMACO E INTESTINO

I campioni di mucosa gastrica prelevati da stomaco e intestino, dopo fissazione in formalina tamponata al 10%, pH = 7.2 -7,4, sono stati processati come di *routine* per esame istologico con ematossilina-eosina.

APPLICAZIONE DI SISTEMI DI SCORE

Al fine di ottenere una valutazione uniforme per tutte le sezioni valutate sono stati applicati, sia a livello gastrico che enterico, alcuni sistemi a punteggio del grado di infiammazione. Alle sezioni di mucosa gastrica fundica e antrale è stato applicato il sistema di valutazione secondo Park *et al.* (2000) e un secondo metodo non derivato dalla letteratura. Le sezioni di ileo, cieco e colon, invece, sono state valutate secondo i sistemi riportati da Mansfield *et al.* (2003) e Kim *et al.* (2010).

1) PARK *et al.* (2000)

La valutazione prevedeva l'assegnazione di un punteggio, da 0 (Figura 20) a 4, alle sezioni osservate, in base alla presenza di cellule infiammatorie associate o meno all'osservazione di follicoli linfoidi nello spessore della lamina propria (tabella 5).

Tabella 5: valutazione del grado di gastrite secondo Park *et al.* (2000).

SCORE	RILIEVI ISTOPATOLOGICI
0	Nessun infiltrato infiammatorio
1	Lieve infiltrato linfoplasmocitario e occasionali eosinofili
2	Moderato infiltrato linfoplasmocitario senza formazione di follicoli linfoidi
3	Moderato infiltrato linfoplasmocitario e presenza di follicoli linfoidi
4	Grave infiltrato linfoplasmocitario e presenza di follicoli linfoidi

2) PUNTEGGIO SECONDO TIPOLOGIA DI CELLULE INFIAMMATORIE e SEDE di LOCALIZZAZIONE

Il sistema utilizzato da Park *et al.* (2000) non considera alcuni fattori come la tipologia di infiltrato infiammatorio e la distribuzione dello stesso. Per questo motivo è stato applicato un sistema di valutazione che considerasse ogni fattore separatamente, assegnando un punteggio da 0 a 3 (nessuna variazione – grave presenza) alla presenza di linfociti, plasmacellule e granulociti eosinofili, un punteggio 0/1 che indicasse l'assenza/presenza di granulociti neutrofili e un punteggio da 0 a 1 (nessuna presenza/ presenza d'infiltrato) per ogni sede considerata. Le sedi assegnate sono 3: porzione superficiale della lamina propria (in prossimità dell'epitelio, al di sotto della membrana basale), spessore della lamina propria e sede profonda, in prossimità della *muscularis mucosae*, senza superarla (Figure 18 e 19).

3) PUNTEGGIO di MANSFIELD *et al.* (2003)

Questo sistema è stato applicato allo studio di sezioni di intestino di suini infettati sperimentalmente con *Campylobacter jejuni* in associazione o meno a *Tricuris suis*. Questo sistema si compone di punteggi assegnati a diversi parametri e misurazioni dello spessore di diversi strati della parete intestinale. I punteggi variano da 0 a 4 (da poche cellule o nessun cambiamento patologico a grave infiltrato infiammatorio e gravi alterazioni patologiche). I parametri considerati sono riassunti in tabella 6.

Tabella 6 :parametri disposti per sede secondo Mansfield *et al.* (2003)

SEDE	PARAMETRO
Lume intestinale	presenza di muco
	presenza di essudato
Epitelio della mucosa	integrità superficiale
	linfociti intraepiteliali (IEL)
	ipertrofia delle <i>goblet cells</i>
	deplezione delle <i>goblet cells</i>
	iperplasia delle cripte
	atrofia delle cripte
	infiammazione delle cripte
Lamina propria e sottomucosa	cellule infiammatorie
	distribuzione delle cellule infiammatorie
Sottomucosa	fibrosi

Nell'assegnazione di punteggi riguardo il parametro "linfociti intraepiteliali (IEL)" sono stati considerati i dati presentati da Rothkötter *et al.* (1999) in cui studi condotti su suini SPF (*Specific Pathogen Free*), *germ-free* e "convenzionali" hanno evidenziato un numero di IEL/100 enterociti, dal 3° mese di età in poi, pari a circa 23.7 ± 4.7 nell'ileo di suini convenzionali. Sono stati considerati, come valori limite rispetto alla fisiologica presenza, un numero di IEL > 25/100 enterociti.

Lo spessore di lamina propria, sottomucosa e tonaca muscolare è stato calcolato come valore medio di 5 campi misurati con *software* di analisi d'immagine LUCIA (*Laboratory Universal Computer Image Analysis*) 4.82.

4) PUNTEGGIO di KIM *et al.* (2010)

Questo tipo di sistema è stato formulato principalmente per indagare il grado di espressione patologica nell'induzione di IBD nel topo e nel suino. In questo caso sono stati identificati diversi parametri a cui sono stati assegnati punteggi da 0 a 3 o da 0 a 4 e il punteggio assegnato è stato poi moltiplicato per la percentuale di estensione (anch'essa indicata con punteggio da 0 a 4). In tabella 7 sono riassunti i parametri e i relativi punteggi.

Tabella n° 7: esemplificazione grafica del sistema usato da Kim *et al.* (2010).

PARAMETRO	PUNTI	DESCRIZIONE	ESTENSIONE	TOTALE
Infiammazione	0	Assente	1 (1-25%)	Range 0 - 12
	1	Lieve	2 (26-50%)	
	2	Moderata	3 (51-75%)	
	3	Grave	4 (76-100%)	
Estensione	0	Assente	1 (1-25%)	Range 0- 12
	1	Limitato alla mucosa	2 (26-50%)	
	2	Mucosa e sottomucosa	3 (51-75%)	
	3	Trasmurale	4 (76-100%)	
Rigenerazione	0	Completa (o tessuto normale)	1 (1-25%)	Range 0- 16
	1	Quasi completa	2 (26-50%)	
	2	Rigenerazione con deplezione delle cripte	3 (51-75%)	
	3	Epitelio superficiale non intatto	4 (76-100%)	
	4	Assente		
Danno alla cripta	0	Nessuno	1 (1-25%)	Range 0- 16
	1	Basale	2 (26-50%)	
	2	1/3 danneggiato	3 (51-75%)	
	3	Integrità del solo epitelio superficiale	4 (76-100%)	
	4	Esteso con perdita di epitelio		

7.2.9 ANALISI STATISTICA

I risultati ottenuti dalle valutazioni istologiche sono stati rapportati ai dati di età e sesso della popolazione esaminata e confrontati per sede anatomica campionata; infine, sono stati indagati rispetto ai risultati ottenuti dall'indagine batteriologica. Queste indagini sono state svolte con test statistici adeguati (test esatto di *Fisher*, test di analisi della varianza per variabili non parametriche U di *Mann Whitney* e *Kruskal-Wallis*) tramite *GraphPad Prism* v. 5.0. (*GraphPad software™*, San Diego, CA, USA). Sono stati considerati significativi i valori di $P < 0,05$.

7.3 Risultati

7.3.1 ISOLAMENTO BATTERICO E IDENTIFICAZIONE GENOTIPICA

In totale, i ceppi ascrivibili a microrganismi gram negativi spirillari, isolati dai diversi terreni, sono stati 286, di cui 80 isolati da raschiato gastrico e 206 da contenuto ciecale. L'elevato numero di ceppi isolati, ottenuti dai terreni di primo isolamento, è da ricondurre al diverso aspetto morfologico macroscopico di colonia che una stessa specie microbica può assumere in diversi terreni. A seguito di clonaggio di tutti i 286 ceppi e successiva identificazione, è stato possibile isolare 2 diverse specie di *Helicobacter* e 5 di *Campylobacter*. Il dettaglio delle diverse specie isolate in ogni soggetto dalle due matrici è riportato in tabella 8. Da raschiato gastrico sono stati identificati 7 animali positivi per almeno una specie batterica, di cui solo uno (ID 6) positivo per una singola specie (*C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii*), mentre gli altri presentavano contemporaneamente almeno una specie di *Helicobacter* ed una di *Campylobacter* contemporaneamente. Relativamente al contenuto ciecale, da tutti i soggetti è stato possibile isolare almeno una specie, e 14 soggetti dei 21 campionati, sono risultati colonizzati a livello intestinale contemporaneamente da una specie di *Helicobacter* ed una di *Campylobacter*. Infine, solo in 7 dei 21 cinghiali campionati, è stata isolata da contenuto ciecale una sola specie batterica, tra cui 4 *Campylobacter* spp. e 3 *Helicobacter* spp..

ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE GENOTIPICA DI *CAMPYLOBACTER* spp.

Attraverso l'utilizzo di m-PCR (protocollo n° 4) è stato possibile identificare tre specie di *Campylobacter*: *C. jejuni*, *C. coli* e *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*. I primi due sono stati isolati da contenuto ciecale in due soggetti, rispettivamente ID 19 e ID 4. Il terzo, invece, è stato evidenziato in raschiati da mucosa gastrica in due soggetti (ID 17 e ID 18).

La maggioranza degli isolati, positivi al genere *Campylobacter*, non identificabile tramite m-PCR, è stata sottoposta a analisi delle sequenze, ottenute dall'amplificazione del gene 16s rRNA (protocollo n° 7). In questo caso è stato possibile definire la presenza di *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii* in 2 soggetti a livello gastrico (ID 6 e ID 19) e di *C. lanienae* in 5 soggetti da mucosa gastrica e in 18 da contenuto ciecale (tabella 8). In 3 soggetti su 5 *C. lanienae* è stato riscontrato sia a livello gastrico che nel contenuto ciecale (ID 17, 19, 22).

Per l'analisi filogenetica e l'esecuzione della PFGE è stato selezionato un isolato di *C. lanienae* da ogni animale positivo, a cui è stato assegnato lo stesso ID dell'animale di appartenenza. In Figura 9, 10 e 11 è riportata l'analisi filogenetica con due delle sequenze analizzate, *Campylobacter* 6 e *Campylobacter* 10.

Dei 20 ceppi di *C. lanienae* analizzati con PFGE, solo 13 hanno dato un *pattern* di restrizione alla digestione con l'endonucleasi *Sma*I. Come si evince dal dendrogramma (Figura 8), è presente un elevato grado di eterogenicità tra i 13 isolati indagati, infatti considerando un *cut-off* > 90% si ottengono 9/13 differenti profili.

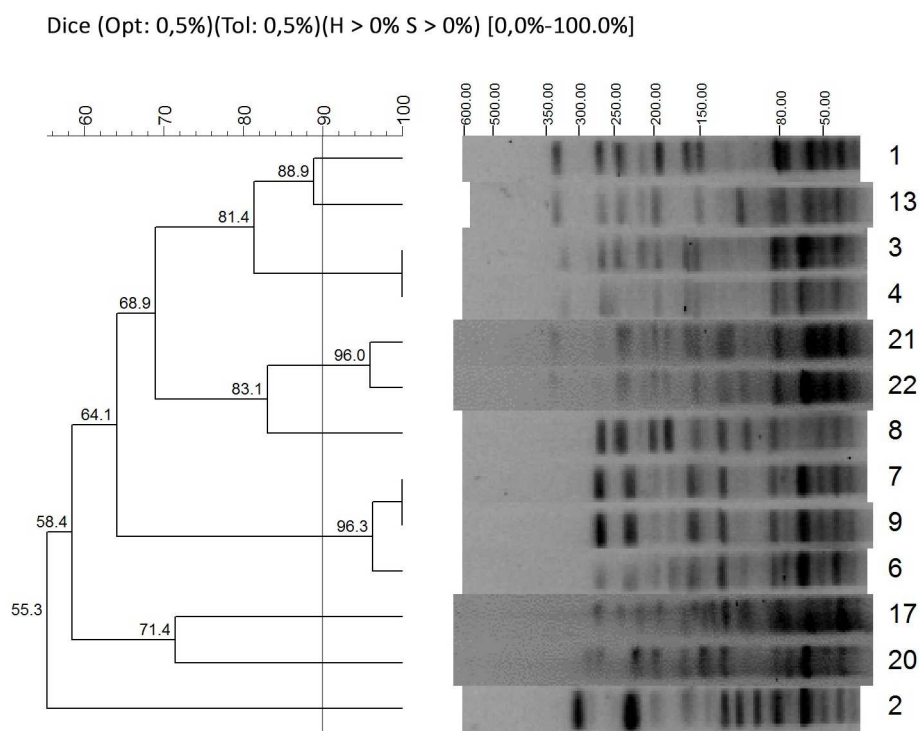


Figura 8: dendrogramma risultante dall'analisi dei 13 ceppi di *C. lanienae* isolati. I numeri sulla barra orizzontale indicano il valore di similarità ottenuto mediante il coefficiente di Dice. La barra verticale indica il *cut-off* > 90 utilizzato per differenziare i vari profili. I numeri laterali indicano i diversi ID dei ceppi esaminati, riferiti all'ID del cinghiale di appartenenza.

Tabella 8: Distribuzione dettagliata delle diverse specie di *Helicobacter* e *Campylobacter* isolate dalle due matrici nei soggetti campionati.

ID Cinghiale	HELICOBACTER			CAMPYLOBACTER				
	Helicobacter *NASD		H. bilis	C. jejuni	C. coli	C. hyointestinalis subsp. hyoitestinalis	C. hyointestinalis subsp. lawsonii	C. lanienae
MUCOSA GASTRICA								
6							+	
17			+			+		+
18			+			+		
19	+						+	+
20	+							+
21	+							+
22	+							+
TOT	4		2			2	2	5
CONTENUTO CIECALE								
1	+							+
2			+					+
3	+							+
4	+				+			+
6	+							+
7	+							+
8	+							+
9	+							+
10								+
11								+
12	+							
13								+
14	+							+
15	+							+
16	+		+					+
17								+
18	+		+					+
19	+			+				+
20	+							
21	+							
22	+							+
TOT	16		3	1	1			18

*NASD = *Helicobacter* Non Ascrivibili a Specie Già Descritte.

ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE GENOTIPICA DI *HELICOBACTER* spp.

Gli isolati positivi a PCR di genere *Helicobacter* microscopicamente fusati, sottoposti a RFLP-PCR specifica per *Helicobacter bilis* (protocollo n° 6), sono risultati appartenere a questa specie, permettendo di segnalare 4 soggetti positivi a questo battere, di cui uno (ID 18) positivo in entrambe le matrici oggetto d'indagine.

Relativamente agli isolati positivi alla PCR di genere *Helicobacter* con morfologia spirillare, l'analisi delle sequenze ottenute con l'amplificazione del gene 16s rRNA, ha permesso di evidenziare un elevato grado di identità genotipica tra le sequenze degli isolati stessi. Il confronto delle sequenze ottenute, con quelle depositate nelle banche dati internazionali eseguito tramite BLAST, non ha permesso di condurre ad un'identificazione a livello di specie, mostrando un grado di similarità del 99% con *Helicobacter* sp. MIT 02-6899 (*Accession Number* AY742308.1) e del 98% con *Helicobacter* sp. Hokurin-1 (*Accession Number* AB275282.1) e con *Helicobacter mastomyrinus* strain MIT 97-5577 (*Accession Number* AY631955.1). Al fine di escludere che si trattasse di ceppi ascrivibili alla specie *H. mastomyrinus*, è stata eseguita una PCR specie specifica (protocollo n° 9), che ha dato esito positivo in 12 campioni su 22. Il tentativo di amplificazione di altri due geni, comunemente utilizzati per l'identificazione del genere *Helicobacter*, i geni *UreAB* e *Hsp60*, è fallito in quanto non è stato possibile ottenere gli amplificati *target*. Dal momento che le diverse indagini genotipiche eseguite non hanno permesso d'identificare gli isolati, si è optato per un approccio identificativo polifasico che comprendesse prove di tipo fenotipico. Gli isolati di *Helicobacter* spp. che non sono stati identificati, sono stati da noi definiti "*Helicobacter* Non Ascrivibili a Specie già Descritte (*H. NASD*)" e nella tesi verranno citati con l'acronimo *H. NASD*.

Relativamente alla ricerca di *H. suis* tramite PCR (protocollo n° 10), nessun campione analizzato ha mostrato la banda attesa.

Infine, per quanto riguarda le analisi biomolecolari eseguite a partire da mucosa gastrica, nessun campione è risultato positivo ai generi *Campylobacter* spp. e *Helicobacter* spp..

ANALISI FILOGENETICA:

Gli alberi filogenetici ottenuti con i tre metodi *Minimum Evolution*, *Maximum Likelihood* e *Bayesian Inference* mostrano una topologia largamente congruente, anche se il supporto nodale (*bootstrap* e/o probabilità a posteriori) può variare notevolmente (Figura 9, 10 e 11). Per quanto riguarda gli isolati di *Campylobacter* (*Campylobacter* 6 e *Campylobacter* 10), l'analisi delle sequenze ottenute dall'amplificazione del gene 16s rRNA ne ha confermato la stretta affinità con la specie *Campylobacter lanienae* (Figure 9, 10, 11), pur evidenziando un certo grado di differenziazione.

Nelle stesse Figure, inoltre, si può osservare come, seppur con alcune differenze, gli isolati *Helicobacter* A, B, C, F, G, H ed I (*Helicobacter* NASD) non possano esser inclusi

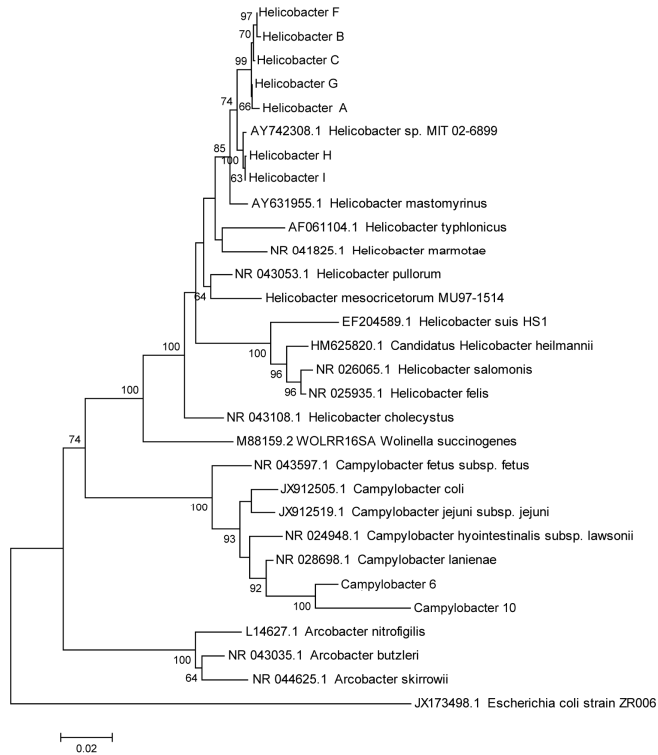


Figura 9: albero filogenetico, in cui si osservano le relazioni tra specie dei generi *Campylobacter* spp., *Helicobacter* spp. e *Arcobacter* spp., costruito con metodo *Minimum Evolution* (SBL = 0,7611), sulla base di sequenze del gene 16s rRNA. I numeri ai nodi indicano il supporto nodale > 50% dopo 500 repliche di *bootstrap*. Si notano i ceppi *Campylobacter* 6 e *Campylobacter* 10 (*C. lanienae*), isolati in questo studio, e gli isolati di *Helicobacter* (F, B, C, G, A e H, I) distinti in due cluster.

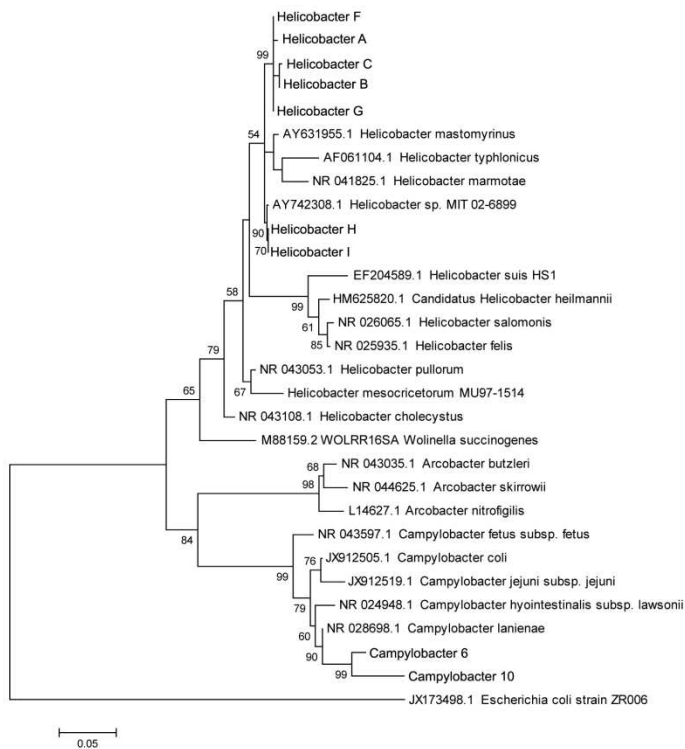


Figura 10: albero filogenetico, in cui si osservano le relazioni tra specie dei generi *Campylobacter* spp., *Helicobacter* spp. e *Arcobacter* spp., costruito con metodo *Maximum Likelihood* (ln L = 5976.7618), sulla base di sequenze del gene 16s rRNA. I numeri al nodo indicano il supporto nodale > 50% dopo 500 repliche di *bootstrap*. Si notano i ceppi *Campylobacter* 6 e *Campylobacter* 10 (*C. lanienae*), isolati in questo studio, e gli isolati di *Helicobacter* (F, A, C, B, G e H, I) distinti in due cluster.

in nessuna delle specie oggetto dell'indagine filogenetica. Come evidenziato dalle Figure 9, 10 e 11, si possono osservare, tra questi isolati, due *cluster* distinti: uno comprendente *Helicobacter* H ed I, e un secondo di cui fanno parte gli altri isolati. Entrambi questi *cluster*, sebbene non rientrino in nessuna specie di quelle esaminate, mostrano affinità maggiore con le specie *H. mastomyrinus*, *H. marmotae* e *H. typhlonius*, isolate da roditori. Inoltre, *Helicobacter* H e I mostrano una affinità molto stretta con una sequenza appartenente a un *Helicobacter* spp. isolato da marmotta, nominato MIT 02-6899, che mostra un 98% di similarità nucleotidica con *H. mastomyrinus* (Shen *et al.*, 2005; codice d'accesso in GenBank: AY742308.1).

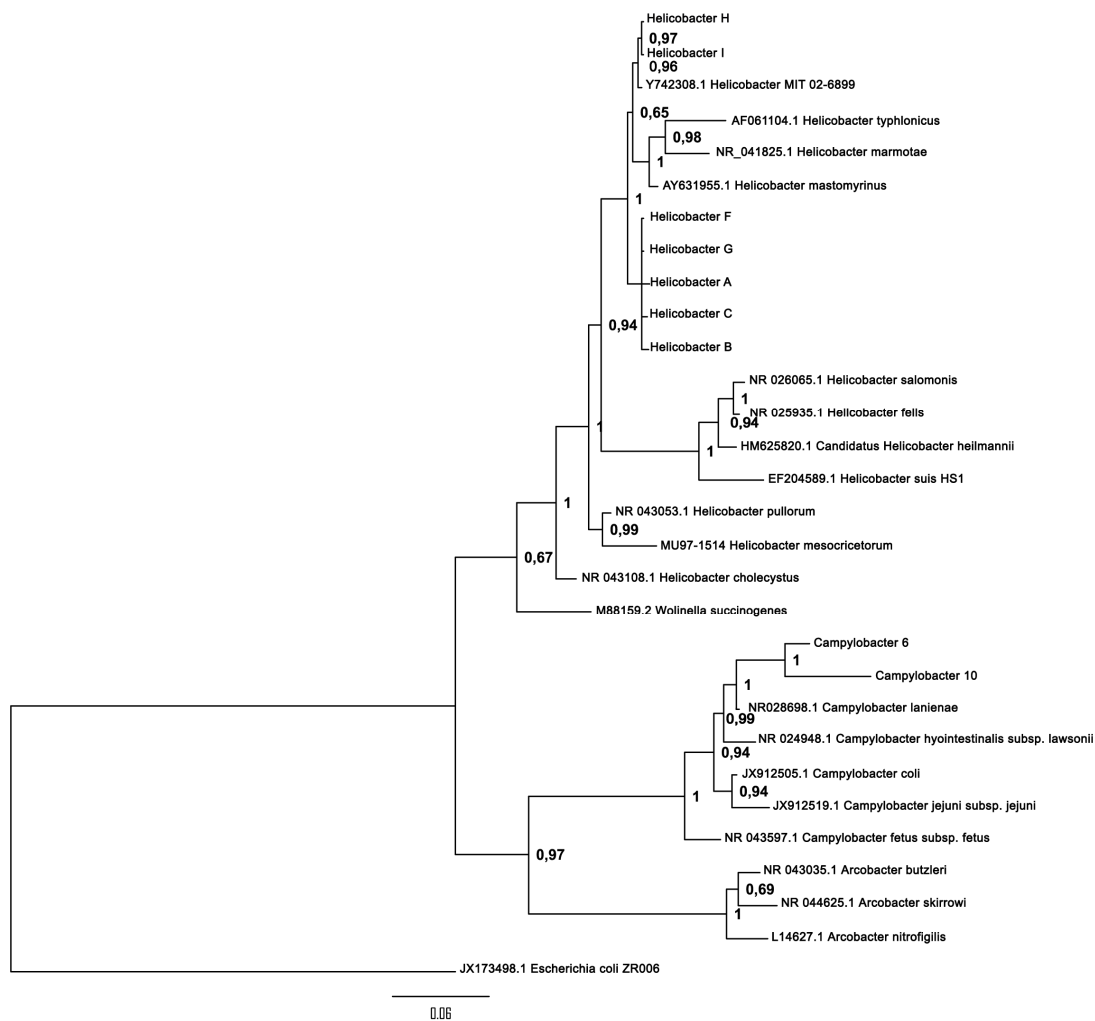


Figura 11: albero filogenetico, in cui si osservano le relazioni tra specie dei generi *Campylobacter* spp., *Helicobacter* spp. e *Arcobacter* spp., costruito con metodo *Bayesian Inference* (ln L = 5975.96), sulla base di sequenze del gene 16s rRNA. I numeri al nodo indicano i valori di probabilità a posteriori. Si notano i ceppi *Campylobacter* 6 e *Campylobacter* 10 (*C. lanienae*), isolati in questo studio, e gli isolati di *Helicobacter* (F, G, A, C, B e H, I) distinti in due *cluster*.

7.3.2 IDENTIFICAZIONE FENOTIPICA DI *HELICOBACTER* NASD

Come accennato in materiali e metodi, per eseguire queste prove sono stati selezionati 19 ceppi, identificati con le lettere dell'alfabeto da A a T, cercando di rappresentare tutti i soggetti positivi o le diverse matrici esaminate.

I risultati ottenuti dalle prove di crescita, test biochimici e test di sensibilità agli antibiotici, hanno evidenziato comportamento omologo. Tutti gli isolati crescevano in microaerofilia a 37°C e 42°C, ma non in anaerobiosi o su terreni addizionati del 1% di glicina o bile. Per quanto riguarda le prove biochimiche, tutti i ceppi hanno dato esito positivo alle prove di: ossidasi, catalasi, fosfatasi alcalina (PAL), idrolisi dell'Indoxyl-acetato e riduzione dei nitrati, mentre risultavano negativi ai test di ureasi e Γ -Glutamyltransferasi (GGT). Nei test di sensibilità agli antibiotici tutti i ceppi sono risultati sensibili a acido nalidixico e resistenti a cefalotina.

In microscopia ottica i preparati allestiti da colture di 48 ore d'incubazione mostravano, con colorazione di gram, elementi cellulari di lunghezza variabile di circa 3 μ m (Figura 12). Le stesse colture, quando valutate dopo più di 5 giorni d'incubazione, mostravano morfologia coccoide. All'esame dell'ultrastruttura, era visibile la presenza di due flagelli "shated", ovvero dotati di guaina, e a distribuzione bipolare (Figure 13 e 14).

Dalla disamina di tutti i test fenotipici condotti sui ceppi isolati è emerso che non erano presenti corrispondenze con le caratteristiche espresse da altre specie già descritte (Lawson *et al.*, 2011), in particolare, in tabella 9, sono evidenziate le differenze fenotipiche con le specie genotipicamente più affini secondo l'analisi filogenetica.

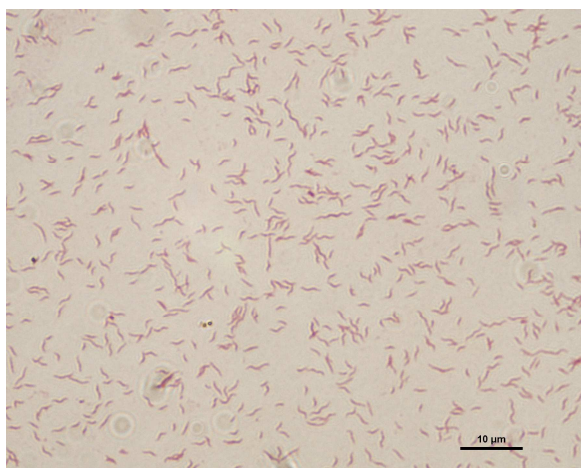


Figura 12: *Helicobacter* NASD, identificati nell'analisi filogenetica e fenotipica come "C". Colorazione di gram, 100X.

Tabella 9: caratteristiche fenotipiche di *Helicobacter* NASD (non appartenenti a specie già descritte) isolati da cinghiale e specie di *Helicobacter* spp. filogeneticamente affini. Per i dati sulle specie *H. marmotae*, *H. mastomyrinus* e *H. typhlonius* si rimanda rispettivamente a Fox *et al.* (2002^o); Shen *et al.* (2005); Franklin *et al.* (2001).

	<i>Helicobacter</i> NASD	<i>Helicobacter</i> <i>marmotae</i>	<i>Helicobacter</i> <i>mastomyrinus</i>	<i>Helicobacter</i> <i>typhlonius</i>
PROVE di CRESCITA				
37°C microaerofilia	+	+	+	+
37°C anaerobiosi	-	ND	ND	-
42°C microaerofilia	+	+	+	+
1% glicina	-	+	+	+
1% bile	-	ND	ND	ND
PROVE BIOCHIMICHE				
Ossidasi	+	+	+	+
Catalasi	+	+	+	+
Idrolisi indoxyl-acetato	+	-	-	-
PAL	+	+	-	-
GGT	-	-	-	-
UREA	-	+	+	-
Riduzione dei nitrati	+	-	-	+
PROVE di SENSIBILITÀ				
Acido nalidixico	S	R	R	S
Cefalotina	R	R	R	R
MORFOLOGIA				
numero e localizzazione dei flagelli	2 –bipolari	2 –bipolari	2 –bipolari	2 –bipolari
“Sheath” - guaina	+	+	+	+

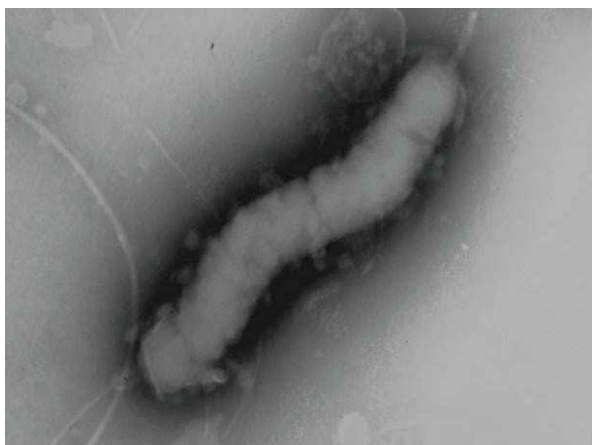


Figura 13: *Helicobacter* NASD, identificati nell'analisi filogenetica come “C”. Si notano i flagelli bipolari e la forma spirillare. 11.000X.



Figura 14: flagello di *Helicobacter* NASD tipo “C”. L'interruzione della guaina in un punto di rottura permette di evidenziarne la presenza, caratterizzandolo come “shated”. 14.000X.

7.3.3 INDAGINE ISTOPATOLOGICA

L'osservazione, tramite i sistemi di valutazione precedentemente descritti, delle sezioni di mucosa gastrica e intestinale ha permesso di conseguire risultati che sono, poi, stati rapportati con indagini statistiche alle caratteristiche di età e sesso della popolazione e ai risultati ottenuti con indagini batteriologiche e biomolecolari.

VALUTAZIONI APPLICATE A SEZIONI GASTRICHE

In tabella 10 e 11 sono riportati, rispettivamente in dettaglio e nel complesso, i risultati scaturiti dalle valutazioni delle due porzioni di mucosa gastrica esaminate. Con sistema secondo Park *et al.* (2000), i valori ottenuti a livello di corpo dello stomaco presentavano mediana pari a 1, mentre a livello pilorico la mediana era pari a 2 (Figura 15; Mann-Whitney U test, $P = 0,006$). Nel secondo sistema di valutazione utilizzato, considerando l'entità dell'infiltrato infiammatorio per singole cellule, i valori riferiti alla presenza di linfociti, plasmacellule ed eosinofili, sono risultati significativamente superiori nella porzione pilorica rispetto al corpo dello stomaco (Figura 17; Mann-Whitney U test: linfociti $P = 0,035$; plasmacellule $P = 0,005$; eosinofili $P = 0,040$). La presenza, quindi, di una maggior quantità di cellule infiammatorie a livello pilorico rispetto al corpo è risultata da entrambi i sistemi di valutazione utilizzati.

Considerando la sede di localizzazione, non sono state riscontrate differenze significative tra la porzione superficiale o profonda di mucosa a livello di corpo rispetto al piloro, mentre l'infiltrato sembra localizzarsi in misura maggiore nello spessore della lamina propria a livello pilorico rispetto al corpo dello stomaco (Fisher's exact test: $P < 0,001$) (Figure 18 e 19).

Rapportando questi dati alle caratteristiche di sesso ed età della popolazione esaminata è emerso che, secondo il sistema di Park *et al.* (2000), il grado d'infiammazione a livello di corpo dello stomaco era significativamente superiore nei maschi rispetto alle femmine (Figura 16; Mann-Whitney U test $P = 0,003$), aspetto non confermato a livello pilorico (Mann-Whitney U test $P = 0,525$) e alle valutazioni secondo il sistema a punteggi che considera la tipologia di cellule infiammatorie e la loro localizzazione. L'età sembra non influenzare il grado d'infiammazione ottenuto secondo Park *et al.* (2000), così come tutti i parametri valutati con il secondo sistema, tranne la presenza di neutrofili a livello pilorico, che sembra verificarsi con più frequenza nei soggetti giovani rispetto agli adulti (Mann-Whitney U test $P = 0,041$).

Tabella 10: risultati dettagliati ottenuti dall'osservazione delle sezioni di mucosa gastrica nei due sistemi di valutazione. (N=neutrofili, L:linfociti, P: plasmacellule; E: eosinofili; S: superficiale; LP: spessore della lamina propria; P: profondo).

ID cinghiale	Park <i>et al.</i> , 2000		Cellule infiammatorie /sede localizzazione													
	corpo	piloro	corpo							piloro						
			N	L	P	E	S	LP	P	N	L	P	E	S	LP	P
1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
2	3	3	1	0	1	1	1	1	0	1	0	2	1	0	1	0
3	1	2	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0
4	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
6	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
7	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
8	3	3	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
9	3	3	1	1	1	0	1	1	0	1	1	2	1	0	1	1
10	1	3	1	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	1	1	1
11	1	3	1	0	1	2	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
12	2	1	1	2	0	2	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
13	1	2	0	1	0	2	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
14	3	3	1	2	2	0	1	0	1	1	1	2	1	1	1	1
15	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	1
16	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
17	2	2	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	2	1	1	1
18	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
19	1	3	0	0	2	2	1	0	1	1	2	2	2	1	1	1
20	1	3	0	1	0	2	0	0	1	1	1	2	2	0	1	1
21	1	3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	2	0	1	1
22	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1

Tabella 11: distribuzione dei punteggi ottenuti nei due sistemi di valutazione. A confronto i punteggi ottenuti nelle due sedi esaminate, si considerano significativi* valori di $P < 0,05$.

Sedi	Park <i>et al.</i> , 2000	N	L	P	E	S	LP	P
Corpo	0: n = 3	0: n = 11	0: n = 14	0: n = 13	0: n = 11	0: n = 14	0: n = 18	0: n = 10
	1: n = 11		1: n = 5	1: n = 6	1: n = 5			
	2: n = 2	1: n = 10	2: n = 2	2: n = 2	2: n = 5	1: n = 7	1: n = 3	1: n = 11
	3: n = 5		3: n = 0	3: n = 0	3: n = 0			
Piloro	0: n = 0	0: n = 10	0: n = 6	0: n = 4	0: n = 2	0: n = 14	0: n = 4	0: n = 7
	1: n = 4		1: n = 13	1: n = 10	1: n = 13			
	2: n = 7	1: n = 11	2: n = 2	2: n = 7	2: n = 16	1: n = 7	1: n = 17	1: n = 14
	3: n = 10		3: n = 0	3: n = 0	3: n = 0			
P value	0,006*	1.000	0,035*	0,005*	0,040*	1.000	<0,001*	0,530

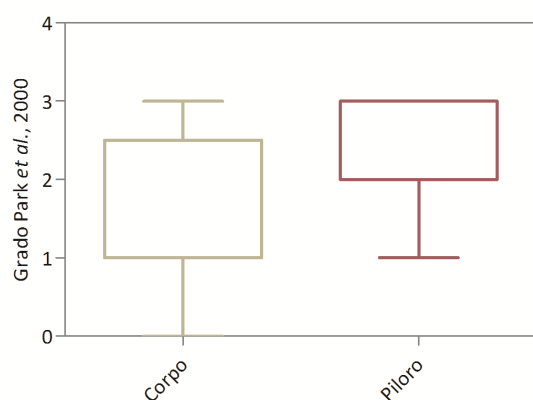


Figura 15: analisi della varianza del punteggio secondo Park *et al.* (2000) valutato su sezioni di corpo e piloro. ($P = 0,006$)

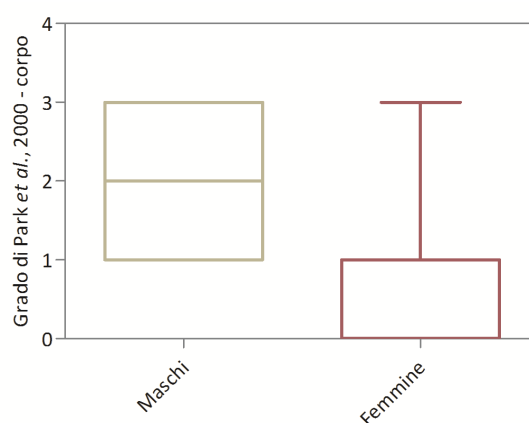


Figura 16: differenze tra maschi e femmine nell'analisi della varianza del punteggio secondo Park *et al.* (2000) valutato su sezioni di corpo. ($P = 0,019$)

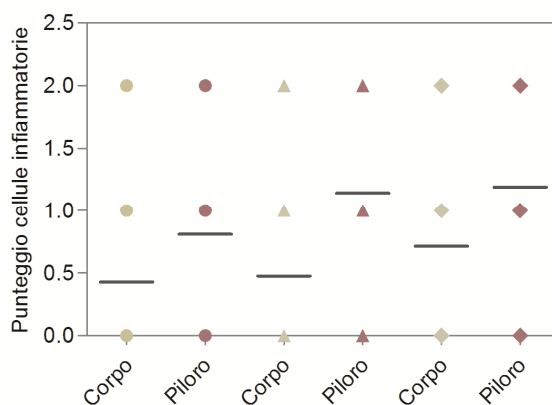


Figura 17: analisi della varianza tra i parametri: linfociti (cerchi), plasmacellule (triangoli) ed eosinofili (rombi), nelle due porzioni di mucosa osservate. (Rispettivamente $P = 0,035$; $P = 0,005$; $P = 0,039$).

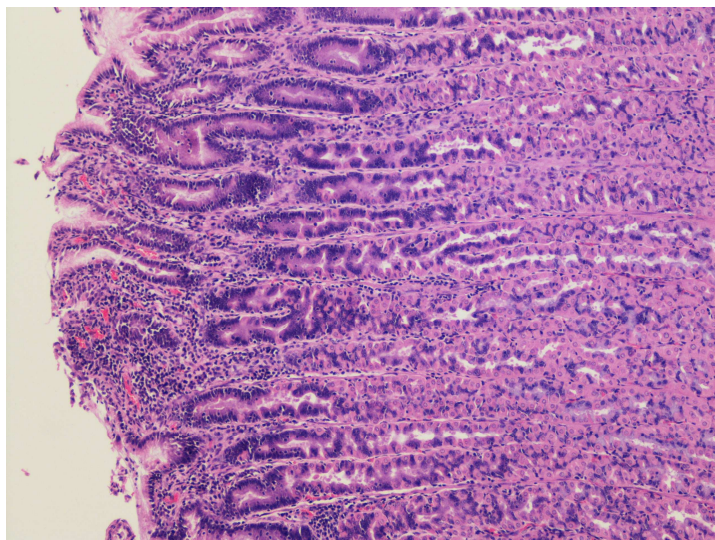


Figura 18: ID 14, corpo dello stomaco. Si nota l'infiltrato infiammatorio localizzato nella porzione superficiale della mucosa. Ematossilina-eosina, 10X.

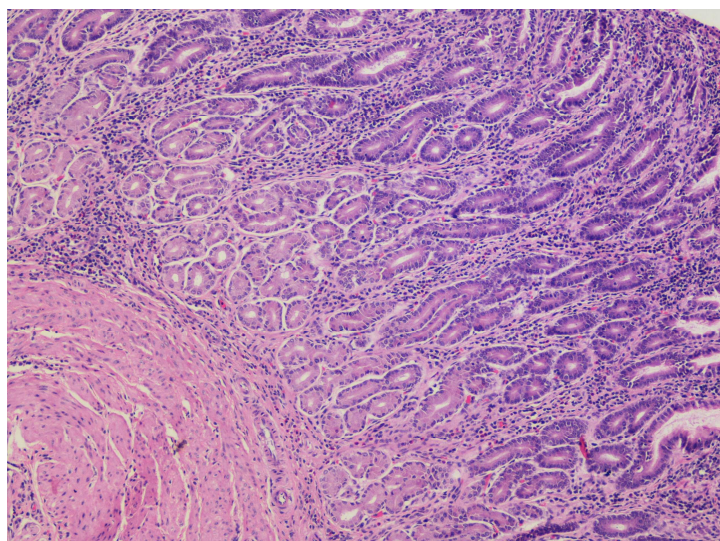


Figura 19: ID 14, stomaco, porzione pilorica. Si nota l'infiltrato infiammatorio diffuso nello spessore della lamina propria della mucosa. Ematossilina-eosina, 10X.

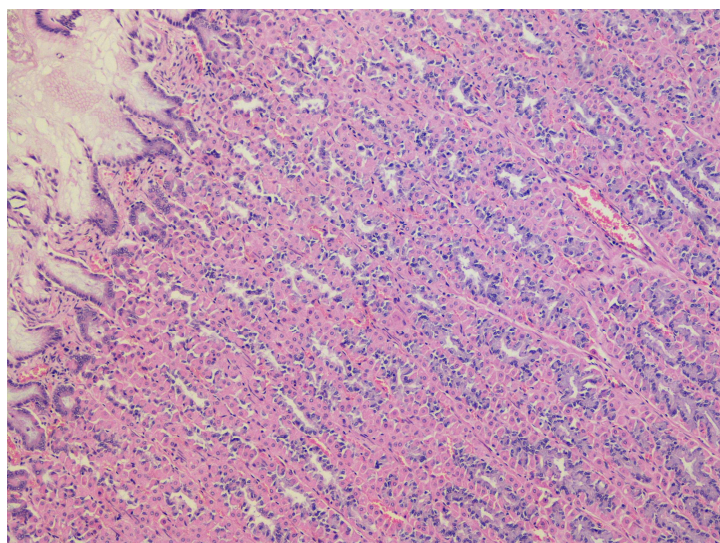


Figura 20: ID 1, corpo dello stomaco. Si nota l'assenza di infiltrato infiammatorio (punteggio di Park *et al.*, 2000 = 0). Ematossilina-eosina, 10X.

APPLICAZIONE DEI SISTEMI DI *KIM et al. (2010)* E *MANSFLIED et al. (2003)* ALL'OSSERVAZIONE DI SEZIONI INTESTINALI DI ILEO, CIECO E COLON.

In tabella 12, 13 e 14 sono riportati in dettaglio i valori ottenuti dalle valutazioni delle sezioni intestinali tramite il sistema di **Mansfield et al. (2003)**. Dal confronto tra i risultati espressi nelle diverse sezioni è emerso che, nell'ileo, la presenza di muco ed essudato nel lume era significativamente maggiore rispetto ai restanti tratti di intestino (Kruskal-Wallis test, rispettivamente $P = 0,007$; $P < 0,001$), inoltre, nello spessore dell'epitelio della mucosa, anche l'incremento di linfociti intraepiteliali (IEL) risultava maggiore nell'ileo (Figura 21) (Kruskal-Wallis test $P < 0,001$). Due esempi di parametri valutati per l'ileo sono riportati in Figura 21 e 22 (IEL e iperplasia delle *goblet cells*). Per quanto riguarda le valutazioni condotte sulla sottomucosa, l'incremento nel numero di cellule infiammatorie si presentava significativamente maggiore, anche in questo caso, nello spessore dell'ileo (Figura 23; Kruskal-Wallis test $P < 0,001$). La comparazione tra le misurazioni effettuate nei diversi strati ha riportato uno spessore maggiore di lamina propria della mucosa e tonaca muscolare nell'ileo (Figure 24 e 26; Kruskal-Wallis test, in entrambi i casi $P < 0,001$), mentre la tonaca sottomucosa appariva più spessa nel cieco (Figura 25; Kruskal-Wallis test $P < 0,001$). Non emergevano, infine, correlazioni significative tra i risultati presentati e le caratteristiche di sesso ed età della popolazione. Nelle tabelle 12, 13 e 14, inoltre, non sono riportati dati riguardanti il grado di fibrosi a livello di sottomucosa poiché nessuna delle sezioni osservate è risultata positiva.

I punteggi ottenuti dalla valutazione delle sezioni istologiche secondo il sistema presentato da **Kim et al. (2010)**, sono riassunti in tabella 15. Tre dei quattro parametri valutati, quando confrontati nei tre tratti, hanno presentato differenze significative: il grado d'infiammazione (Kruskal-Wallis test $P < 0,001$), il grado di estensione della stessa (Kruskal-Wallis test $P = 0,005$) e di danno alle cripte (Kruskal-Wallis test $P < 0,001$); in tutti i casi questi parametri si presentavano nettamente superiori nell'ileo rispetto ai restanti tratti intestinali (Figura 27). Analizzando i valori presentati per ogni sezione con l'età in mesi dei soggetti campionati, non sono evidenziabili differenze statisticamente significative ma, suddividendo l'età in classi, come riportato nel campionamento (classe 1: 0-6 mesi; classe 2: 7-14 mesi; classe 3 > 14 mesi), gli aspetti d'infiammazione di cieco e colon (Kruskal-Wallis test rispettivamente $P = 0,013$ e $P = 0,036$), così come l'estensione dell'infiammazione (Kruskal-Wallis test $P = 0,016$) e il danno alla cripta (Kruskal-Wallis test $P = 0,043$) per il cieco, risultano maggiori nei soggetti di classe 1, mentre diminuiscono con l'età adulta (Figure 28, 29 e 30). Questi aspetti non erano presenti nei parametri valutati su sezioni di ileo.

Tabella 12: tabulato in dettaglio dei punteggi ottenuti da sezioni di ileo, secondo Mansfield *et al.* (2003). (M: muco nel lume; E: essudato nel lume; IS: integrità superficiale della mucosa; IEL: linfociti intraepiteliali; IGC: iperplasia *goblet cells*; DGC: deplezione *goblet cells*; IC: iperplasia delle cripte; AC: atrofia delle cripte; FC: flogosi delle cripte; CI: cellule infiammatorie nella sottomucosa; DC: distribuzione delle cellule infiammatorie nella sottomucosa).

ILEO														
ID	M	E	IS	IEL	IGC	DGC	IC	AC	FC	CI	DCI	LP (μm)	S (μm)	Mus (μm)
1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	1	613,32	262,03	603,01
2	2	1	0	1	1	0	1	0	1	2	1	611,08	249,39	565,28
3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	1	960,27	266,57	598,67
4	2	1	0	1	0	0	0	0	0	2	1	739,12	191,89	612,38
6	1	0	0	1	1	0	1	0	0	2	1	760,93	236,62	688,03
7	1	0	1	2	1	0	1	0	0	2	3	563,49	202,05	902,9
8	1	0	1	1	1	0	0	0	0	2	2	665,52	230,31	658,02
9	2	1	1	1	1	0	1	0	0	2	1	572,18	183,56	556,81
10	2	1	0	1	1	0	1	0	1	2	1	715,24	241,8	645,15
11	2	0	0	1	1	0	1	0	0	2	2	695,83	442,1	629,86
12	1	1	0	1	2	0	2	0	0	3	1	810,93	315,46	744,82
13	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	227,17	402,39	227,41
14	1	0	0	1	0	0	0	0	0	3	1	702,9	104,27	519,2
15	2	0	0	2	1	0	0	0	1	2	1	778,45	328,06	903,06
16	2	0	0	1	1	0	1	0	0	3	1	520,46	221,95	690,32
17	2	1	0	0	1	0	0	0	0	2	1	829,25	263,32	1455,23
18	1	1	0	1	1	0	0	0	0	2	1	865,28	254,63	698,3
19	1	1	0	1	1	0	1	0	0	3	1	724,37	230,33	846,89
20	1	1	1	2	2	0	1	0	0	2	1	844,01	533,4	1037,07
21	1	0	0	0	1	0	1	0	0	2	2	764,65	260,57	1264,94
22	2	0	0	1	2	0	1	0	0	2	2	845,94	208,19	619,96

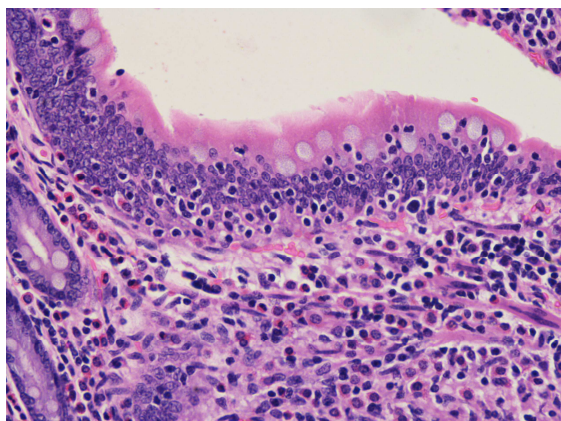


Figura 21: ID 12, ileo. Incremento di linfociti intraepiteliali (IEL) nell'epitelio della mucosa. Ematossilina-eosina, 40X.

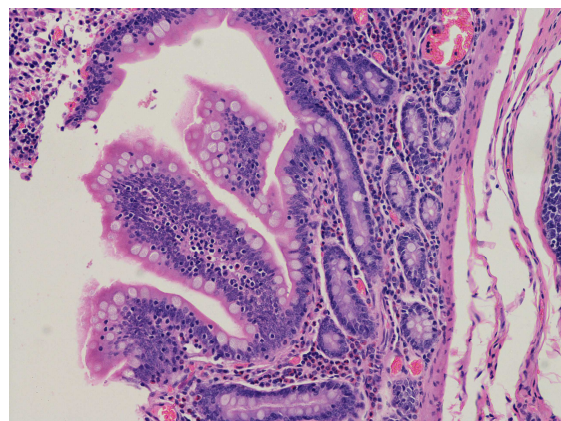


Figura 22: ID 12, ileo. Incremento di *goblet cells* (GC) nell'epitelio della mucosa. Ematossilina-eosina, 20X.

Tabella 13: tabulato in dettaglio dei punteggi ottenuti da sezioni di cieco, secondo Mansfield *et al.* (2003). (M: muco nel lume; E: essudato nel lume; IS: integrità superficiale della mucosa; IEL: linfociti intraepiteliali; IGC: iperplasia *goblet cells*; DGC: deplezione *goblet cells*; IC: iperplasia delle cripte; AC: atrofia delle cripte; FC: flogosi delle cripte; CI: cellule infiammatorie nella sottomucosa; DC: distribuzione delle cellule infiammatorie nella sottomucosa)

CIECO														
ID	M	E	IS	IEL	IGC	DGC	IC	AC	FC	CI	DCI	LP (μm)	S (μm)	Mus (μm)
1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	250,44	1310,92	387,85
2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	255,85	243,15	263,34
3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	354,87	692,35	704,51
4	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	1	436,06	539,83	403,57
6	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	333,6	423,91	270,66
7	1	0	1	0	0	0	1	0	0	2	2	352,5	682	844,75
8	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	361,56	196,22	482,61
9	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	198,58	407,07	361,75
10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	282,92	716,82	423,69
11	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	252,45	843,8	450,4
12	2	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	369,88	800,51	884,06
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	340,9	135,21	435,87
14	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	1	324,8	384,45	348,08
15	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	374,38	1334,55	480,3
16	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	302,4	780,87	265,3
17	1	0	0	0	1	0	1	0	0	2	1	317,42	478,19	310,25
18	2	0	0	0	1	0	0	0	0	2	1	369,64	195,73	259,16
19	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	315,7	370,73	385,57
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	371,92	449,86	317,72
21	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	2	339,14	301,64	647,37
22	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	496,41	179,7	408,31

Tabella 14: punteggi in dettaglio delle valutazioni su sezioni di colon secondo Mansfield *et al.*(2003). (M: muco nel lume; E:essudato nel lume; IS:integrità superficiale della mucosa; IEL: linfociti intraepiteliali; IGC: iperplasia *goblet cells*; DGC: deplezione *goblet cells*; IC: iperplasia delle cripte; AC: atrofia delle cripte; FC: flogosi delle cripte; CI: cellule infiammatorie nella sottomucosa; DC: distribuzione delle cellule infiammatorie nella sottomucosa).

COLON														
ID	M	E	IS	IEL	IGC	DGC	IC	AC	FC	CI	DCI	LP (µm)	s (µm)	Mus (µm)
1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	245,76	641,9	349,33
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	197	263,3	171,75
3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	292,61	482,94	262,17
4	1	0	1	0	1	0	0	0	0	2	2	408,33	666,16	233,91
6	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	350,67	501,86	598,05
7	1	0	0	0	1	0	1	0	0	2	1	355,49	444,12	314,39
8	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	280,73	581,53	256,2
9	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	315,22	455,41	255,59
10	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	311,1	639,72	401,53
11	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	294,07	338,89	372,63
12	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	390,49	382,29	626,13
13	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	227,17	402,39	227,41
14	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2	1	291,28	180,39	351,54
15	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	1	351,61	646,97	749,88
16	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	312,56	404,25	388,32
17	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	556,81	363,47	977,16
18	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	337,06	315,76	374,81
19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	435,63	192,64	198,78
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	529,83	485,88	1122,95
21	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	621,91	357,76	919,17
22	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	2	574,11	437,15	940,09

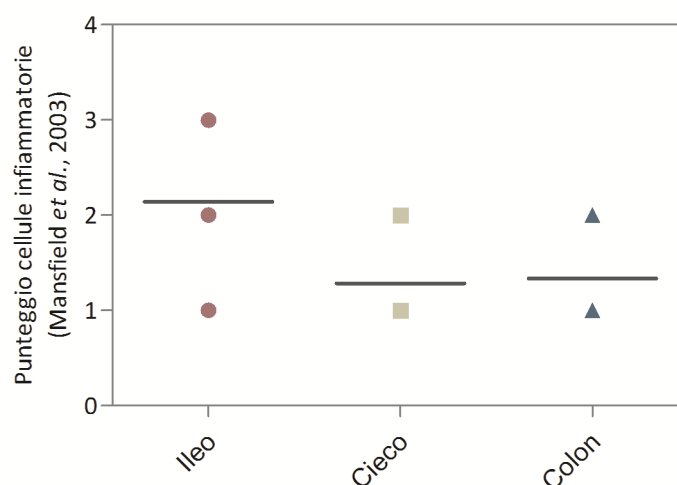


Figura 23: analisi della varianza sui risultati ottenuti dall'assegnazione dei punteggi per presenza di cellule infiammatorie nella sottomucosa, (Mansfield *et al.*, 2003) delle tre porzioni di intestino esaminate. Il punteggio dell'ileo risulta significativamente superiore rispetto agli altri tratti ($P < 0,001$).

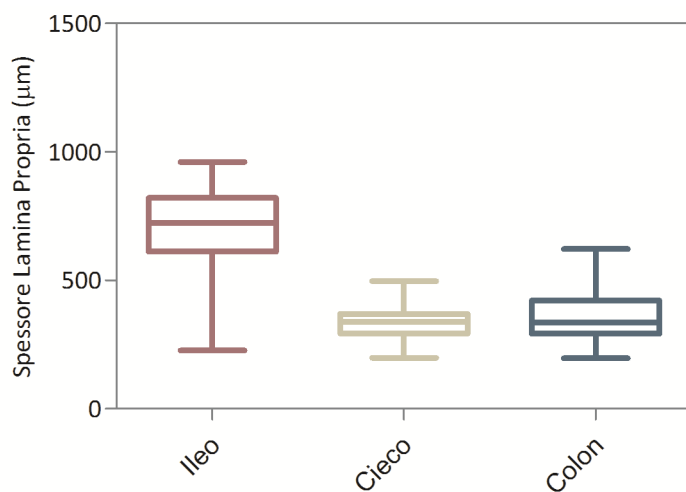


Figura 24: analisi della varianza sui risultati ottenuti dalle misurazioni dello spessore della lamina propria nelle tre porzioni intestinali esaminate.

Lo spessore della lamina propria dell'ileo risulta significativamente superiore rispetto agli altri tratti ($P < 0,001$).

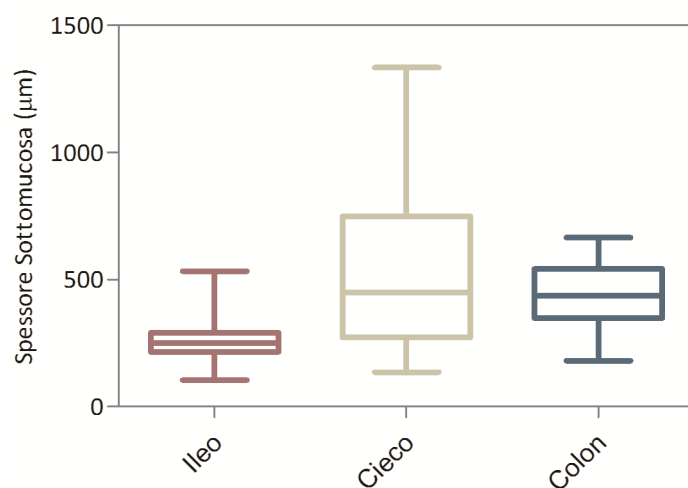


Figura 25: analisi della varianza sui risultati ottenuti dalle misurazioni dello spessore della sottomucosa nelle tre porzioni intestinali esaminate.

Lo spessore della sottomucosa del cieco risulta significativamente superiore rispetto agli altri tratti ($P < 0,001$).

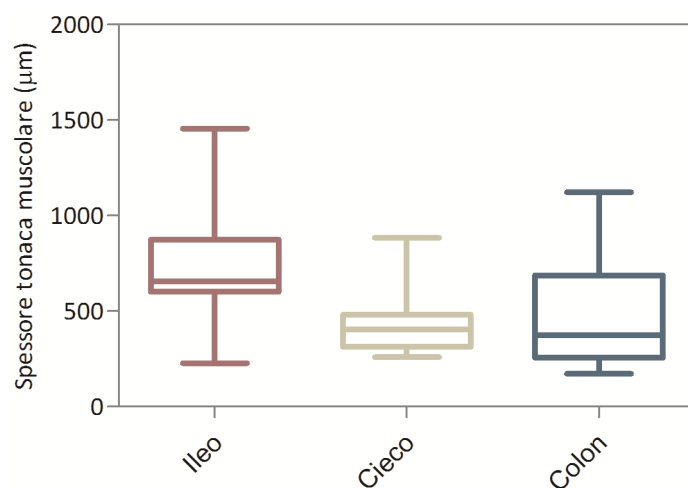


Figura 26: analisi della varianza sui risultati ottenuti dalle misurazioni dello spessore della tonaca muscolare nelle tre porzioni intestinali esaminate.

Lo spessore della tonaca muscolare dell'ileo risulta significativamente superiore rispetto agli altri tratti ($P < 0,001$).

Tabella 15: risultati in dettaglio delle valutazioni condotte su sezioni intestinali tramite il sistema proposto da Kim et al. (2010) (I: infiammazione; E: estensione; R: rigenerazione; DC: danno alla cripta).

ID cinghiale	Kim et al., 2010											
	ileo				cieco				colon			
	I	E	R	DC	I	E	R	DC	I	E	R	DC
1	3	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	6	3	4	4	1	1	0	0	2	2	0	0
3	3	2	1	2	0	0	0	0	2	2	1	1
4	6	3	1	2	3	3	1	1	3	3	1	1
6	6	3	0	0	4	4	2	2	6	4	1	0
7	6	3	1	2	6	3	1	1	2	1	0	0
8	6	3	1	0	4	3	1	1	2	2	0	0
9	3	2	1	2	2	2	1	2	3	3	2	1
10	6	3	2	0	2	2	1	0	6	3	1	0
11	8	3	1	2	3	2	0	0	0	0	0	0
12	6	3	2	1	1	1	0	0	1	1	0	0
13	3	3	12	4	6	3	12	2	2	2	1	0
14	2	2	1	1	4	2	1	1	2	2	0	0
15	4	2	2	2	3	2	1	1	2	4	0	0
16	6	3	1	1	2	2	1	0	1	1	0	0
17	2	2	0	1	2	2	0	0	1	1	0	0
18	6	3	0	0	2	2	0	0	1	2	0	0
19	3	3	1	2	2	2	2	1	1	1	0	0
20	6	3	0	0	3	3	0	0	2	2	0	0
21	6	3	0	0	2	2	0	0	1	1	0	0
22	6	3	0	1	3	3	1	1	4	3	1	1
Mediana	6	3	1	1	2	2	1	0	2	2	0	0

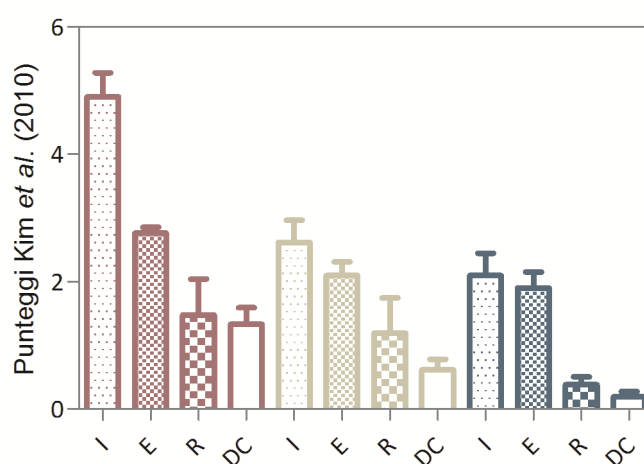


Figura 27: analisi della varianza dei risultati ottenuti dalle osservazioni di sezioni, rispettivamente, di ileo, cieco e colon tramite il sistema proposto da Kim et al. (2010). I parametri di infiammazione (I), estensione dell'infiammazione (E) e danno alla cripta (DC) sono risultati significativamente superiori nell'ileo rispetto ai restanti tratti ($P < 0,001$; $P = 0,005$; $P < 0,001$).

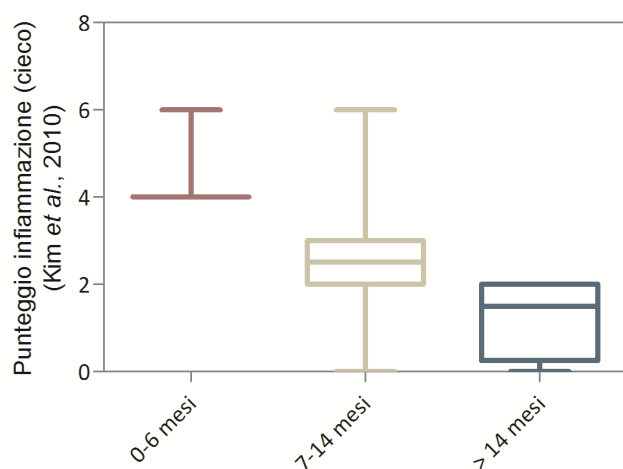


Figura 28: analisi della varianza dei punteggi ottenuti con parametro “infiammazione” secondo Kim *et al.* (2010) in relazione alle classi di età. Punteggi significativamente superiori nei soggetti più giovani ($P = 0,013$).

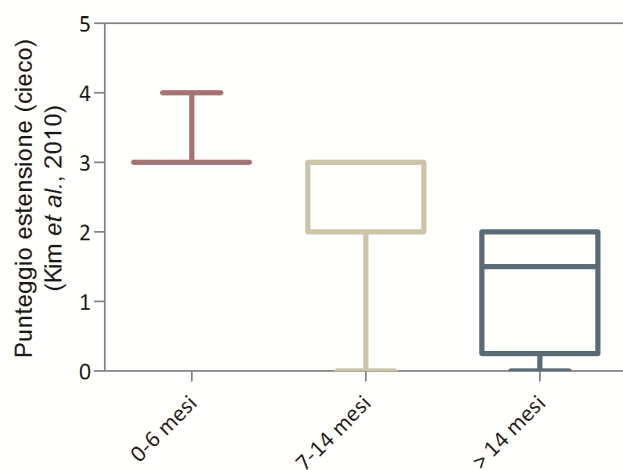


Figura 29: analisi della varianza dei punteggi ottenuti con parametro “estensione dell’infiammazione” secondo Kim *et al.* (2010) in relazione alle classi di età. Punteggi significativamente superiori nei soggetti più giovani ($P = 0,016$).

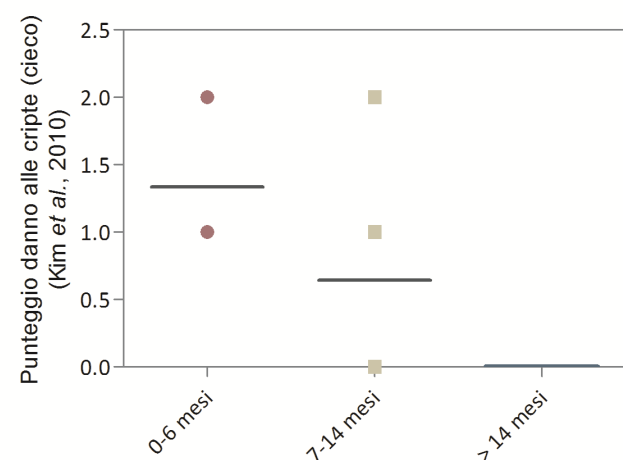


Figura 30: analisi della varianza dei punteggi ottenuti con parametro “danno alla cripta” secondo Kim *et al.* (2010) in relazione alle classi di età. Punteggi significativamente superiori nei soggetti più giovani ($P = 0,043$).

7.3.4 VALUTAZIONE ISTOLOGICA E CORRELAZIONE AI RISULTATI BATTERIOLOGICI

I risultati ottenuti dalle osservazioni condotte sui preparati istologici con i diversi sistemi di valutazione sono, infine, stati analizzati secondo i risultati emersi dalle indagini di isolamento batterico e identificazione genotipica.

Riguardo allo **stomaco**, non è emersa alcuna relazione tra la presenza di microrganismi dei generi *Helicobacter* spp. e *Campylobacter* spp. isolati in questo studio e i punteggi ottenuti con il sistema di Park *et al.* (2000), in particolare non è stata osservata alcuna relazione con la presenza di follicoli linfoidi nello spessore della mucosa (punteggi ≥ 3).

Il secondo sistema di punteggi, basato su valutazione delle singole cellule infiammatorie presenti e della loro localizzazione, ha portato a risultati significativi solo per quanto riguarda l'entità dell'infiltrato eosinofilo in presenza di batteri che, nella porzione pilorica, risulta significativamente maggiore (Mann-Whitney U test $P = 0,037$) (Figura 32). Questo parametro, quando valutato a livello di corpo dello stomaco, non porta a un risultato significativo, ma dimostra comunque una tendenza maggiore nei soggetti positivi per i microrganismi considerati (Mann-Whitney U test $P = 0,051$) (Figura 31).

A livello **intestinale**, utilizzando i parametri considerati nel sistema di Mansfield *et al.* (2003), solo i valori corrispondenti alla misurazione degli strati intestinali hanno dato alcune corrispondenze con la presenza dei batteri considerati. In particolare, sembra che lo spessore della lamina propria, quando considerata nei tre tratti contemporaneamente, sia maggiore nei soggetti positivi per *H. NASD* (Kruskal-Wallis test $P = 0,039$), così come la tonaca muscolare (Kruskal-Wallis test $P = 0,008$) (Figura 33).

Analizzando i singoli parametri ottenuti dal sistema di valutazione secondo Kim *et al.* (2010) in relazione alla presenza dei microrganismi isolati, invece, non sono emersi risultati significativi.

La presenza di *H. bilis* non ha dato risultati significativi quando rapportata ai parametri valutati in stomaco e intestino, così come la positività a *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* nello stomaco e *C. jejuni* e *C. coli* nell'intestino.

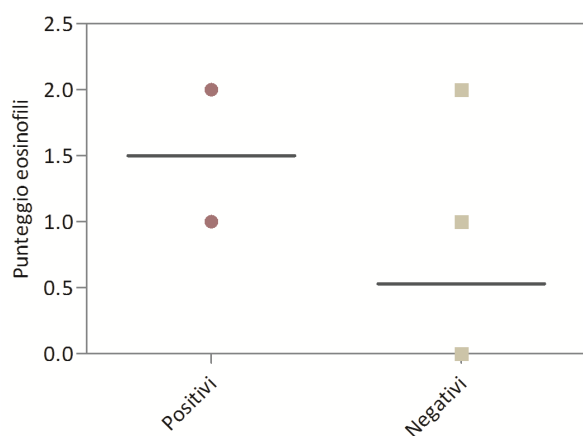


Figura 31: analisi della varianza dei punteggi ottenuti nella valutazione del parametro “eosinofili” nei soggetti positivi (*Helicobacter* NASD e *Campylobacter lanienae*) e negativi a livello di corpo dello stomaco. ($P = 0,051$)

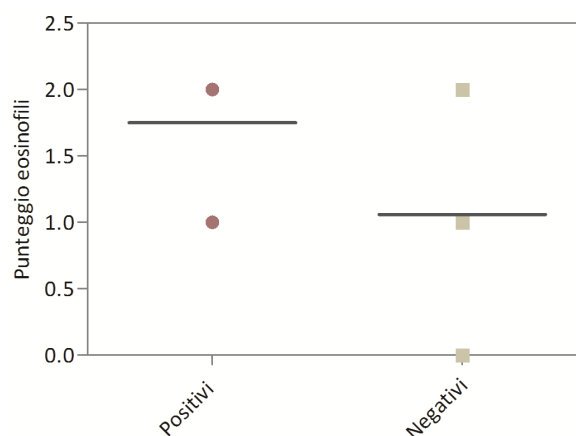


Figura 32: analisi della varianza dei punteggi ottenuti nella valutazione del parametro “eosinofili” nei soggetti positivi (*Helicobacter* NASD e *Campylobacter lanienae*) e negativi a livello di porzione pilorica. ($P = 0,037$)

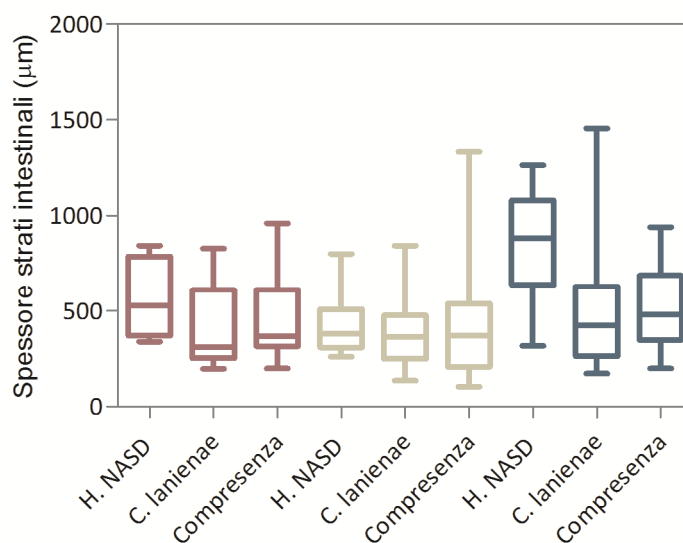


Figura 33: analisi della varianza degli spessori intestinali di lamina propria (in rosso), sottomucosa (in grigio) e tonaca muscolare (in blu), di soggetti positivi solamente per *Helicobacter* NASD, *Campylobacter lanienae* o per entrambi i microrganismi considerati. La differenza tra le mediane considerate risulta significativa nello spessore di lamina propria ($P = 0,039$) e tonaca muscolare ($P = 0,008$), dove gli spessori sono maggiori nei soggetti positivi al solo *H. NASD*.

7.4 Discussione

Al momento, secondo quanto riportato in bibliografia, questo studio risulta essere il primo mirato a rilevare la presenza di *Campylobacter* spp. e *Helicobacter* spp. da mucosa gastrica e contenuto ciecale in cinghiali selvatici abbattuti in Italia.

Relativamente ai risultati ottenuti nelle indagini sul genere *Campylobacter*, si nota come nella popolazione esaminata sia stato possibile riscontrare *C. lanienae* in numero elevato (20/21 soggetti positivi – 95,2%), mentre *C. jejuni* e *C. coli* sono stati isolati dal contenuto ciecale di un solo animale campionato (4,7% ciascuno). Infine, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* e *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* sono stati rilevati, in soli 2 animali rispettivamente, solo a livello gastrico (9,5% ciascuno).

Questo lavoro ha portato, quindi, al primo isolamento di *C. lanienae* (con percentuale di positività elevata), *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* e *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* (con positività percentuale inferiore) da cinghiale selvatico.

Dalla letteratura emerge che gli unici due studi mirati alla ricerca di *Campylobacter* spp. nel cinghiale selvatico, condotti in Svezia e Svizzera, hanno ottenuto risultati divergenti rispetto al presente lavoro. Sebbene le percentuali di *C. jejuni* e *C. coli* isolati in Svezia siano simili a quelle da noi riscontrate (rispettivamente 3% e 4,5%), e siano stati isolati due ceppi di *Campylobacter* spp. non identificati a livello di specie, in nessuno dei due lavori è riportata la presenza di *C. lanienae* ed entrambe le subspecie di *C. hyointestinalis* (Wahlström *et al.*, 2003; Wacheck *et al.*, 2010).

Risultati simili a quelli presentati in questa tesi, invece, sono riportati da Jay-Russel *et al.* (2012) in uno studio condotto su ibridi ottenuti da suini domestici divenuti selvatici e incrociati con cinghiali, chiamati “feral swine”, negli Stati Uniti, dove gli autori hanno isolato sia *C. lanienae* che *C. hyointestinalis* da contenuto ciecale e tamponi rettali, nonostante le percentuali d’isolamento si distribuissero diversamente (*C. jejuni* 40%, *C. lanienae* 20%, *C. hyointestinalis* 6,6% e *C. coli* 3,3%).

Esaminando questi lavori è emerso che, nei primi due casi, ovvero quelli riguardanti il cinghiale selvatico, le procedure d’isolamento, quando attuate, erano costituite dall’utilizzo di terreni selettivi con incubazione in microaerofilia a 42°C, mentre nel lavoro condotto in Svizzera all’isolamento da *pool* fecali è stato preferito l’utilizzo di sistemi di *screening* VIDAS®, ovvero un saggio immunoenzimatico a fluorescenza che utilizza un *kit* di rilevamento per *Campylobacter* spp. denominato CAM-kit.

Nel lavoro condotto negli Stati Uniti sul suino selvatico, invece, gli autori hanno proceduto all’isolamento utilizzando, in parallelo, sia terreni selettivi con pre-arricchimento (isolando *Campylobacter* spp. in 13 campioni su 35) con incubazione a 42°C, sia terreni non selettivi mediante filtrazione (isolando *Campylobacter* spp. in 9 su 11 campioni analizzati) con incubazione a 37°C. In questo caso, secondo quanto riportato dagli stessi autori, *C. lanienae* è stato isolato prevalentemente tramite filtrazione (5 casi su 6), così come *C. hyointestinalis* (2/2).

L'ultima metodica riportata è quella che più si sovrappone a quella utilizzata nella presente tesi, inoltre, di notevole importanza, un fattore discriminante rispetto agli studi riportati nel cinghiale è il tempo di stoccaggio del campione prima della processazione. In questa tesi gli organi venivano prelevati entro un ora dall'abbattimento e non venivano mai superate le tre ore di tempo dal prelievo degli stessi alla processazione dei campioni di raschiato gastrico e contenuto ciecale. I campioni di feci da cui è stata condotta l'indagine su cinghiali in Svezia, invece, venivano prelevati dagli addetti alla caccia e stoccati refrigerati o congelati a -20°C per un numero di giorni variabile da 3 a 7, per poi esser spediti per posta ordinaria al laboratorio (Wahlström *et al.*, 2003).

Le diverse metodiche di stoccaggio e processazione dei campioni, quindi, potrebbero essere alla base dei diversi risultati riscontrati tra il presente lavoro e quanto riportato in bibliografia.

Oltre a questo dato è possibile asserire che *C. lanienae* sembra ben adattato al cinghiale poiché, oltre ad essere presente in quasi tutti i soggetti esaminati (20/21), era abbondante già sulle piastre di primo isolamento, sia da contenuto ciecale che da raschiato gastrico, laddove è stato isolato. Inoltre, dai risultati forniti dalla PFGE si può escludere che i ceppi da noi identificati possano appartenere ad un unico clone circolante nella popolazione, poiché i profili di restrizione mostrano ceppi ad elevata eterogenicità genomica.

Riguardo agli isolati da noi identificati, infine, è necessario sottolineare che sia per *C. jejuni*, *C. coli* (Man, 2011); e *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* è stato provato il potenziale zoonosico (Gorkiewicz *et al.*, 2002), mentre è stato solo ipotizzato per *C. lanienae*. Questo battere, infatti, è stato descritto per la prima volta in campioni di feci di due uomini asintomatici addetti alla macellazione suina e bovina in Svizzera (Logan *et al.*, 2000). Sebbene la trasmissione di *Campylobacter* spp. avvenga principalmente tramite altre fonti ben più diffuse (ingestione di carni di pollame poco cotte o mal conservate, latte crudo non pastorizzato o acque contaminate) è importante considerare il ruolo zoonosico che questi batteri potrebbero assumere nel cinghiale, soprattutto nei confronti dei cacciatori e del personale addetto durante la macellazione e manipolazione di visceri e carni.

Riguardo il lavoro svolto in questa tesi sui batteri del genere *Helicobacter*, è stato isolato per la prima volta nel cinghiale *H. bilis*, già isolato sia a livello gastrico che intestinale nel suino domestico (Hänninen *et al.*, 2003), ma mai riportato in campioni provenienti da cinghiale selvatico. In questa specie animale, infatti, i pochi studi condotti hanno identificato batteri del genere *Helicobacter*, non identificati a livello di specie, in un soggetto in cattività (in cui il battere isolato presentava elevata identità con *H. whingamensis*) e in un solo cinghiale in libertà (*Helicobacter* spp. con elevata identità con *H. Heilmannii* tipo 2) (Abu Al-Soud *et al.*, 2003; Fabisiak *et al.*, 2010). Nel lavoro svolto in Polonia da Fabisiak *et al.* (2010), gli autori hanno identificato in 1 soggetto dei 17 campionati, *Helicobacter* spp. da mucosa gastrica tramite PCR specifica per genere *Helicobacter*. Una volta sequenziato e analizzato il prodotto della

PCR, questo presentava un'omologia del 99% con sequenze geneticamente correlate a *Helicobacter heilmannii* tipo 2. Nel nostro caso, tramite PCR diretta da mucosa gastrica non è stato possibile identificare nessun campione positivo per i generi *Helicobacter* spp. o *Campylobacter* spp., nonostante l'isolamento sia stato efficace nel dimostrare la presenza di entrambi i generi considerati. Questa discrepanza potrebbe esser dovuta al campione analizzato: l'isolamento, infatti, è stato condotto su raschiato gastrico di metà porzione dello stomaco, mentre la PCR da mucosa è effettuata da 4 µl di estratto di DNA ottenuto da una piccola porzione (25 mg) di mucosa gastrica. Il raschiato da un'emi-porzione di organo contiene sicuramente un inoculo maggiore di quello che è possibile ottenere da una piccola porzione di mucosa, come riportato anche da Baele *et al.* (2008), ciò potrebbe non inficiare i risultati quando la colonizzazione gastrica è abbondante e omogeneamente distribuita, al contrario, qualora i batteri si trovassero in moderata quantità e con distribuzione localizzata in alcune porzioni di mucosa, l'esecuzione della sola PCR potrebbe non essere sufficiente a individuare la presenza di batteri. *Helicobacter suis*, comunque, non è stato identificato in nessuno dei campioni da noi esaminati sia tramite PCR sia con procedura d'isolamento, nonostante siano state seguite pedissequamente le indicazioni riportate da Baele *et al.* (2008) per l'isolamento di questo microrganismo, procedura che si presenta indaginosa proprio perché *H. suis* è considerato un battere di difficile coltivazione.

Particolare importanza riveste un altro risultato ottenuto in questo studio, ovvero l'isolamento di *Helicobacter* da noi definiti NASD (non ascrivibili a specie finora descritte). La maggior parte degli *Helicobacter* isolati in questo studio, infatti, non sono ascrivibili alla specie *H. bilis*. Le prove genotipiche e l'analisi filogenetica, applicate sul solo gene 16s rRNA di questi isolati, non hanno permesso di includerli in nessuna delle specie finora descritte, anche se ne hanno evidenziato l'affinità con *H. mastomyrinus*, *H. thyplonius* e *H. marmotae*. Quando confrontati con le caratteristiche fenotipiche espresse, però, gli isolati da noi chiamati *Helicobacter* NASD e le specie filogeneticamente affini hanno mostrato caratteristiche differenti, tra cui la mancata produzione di ureasi (che li differenzia da *H. mastomyrinus* e *H. marmotae*), la capacità di produrre esterasi, che idrolizza l'indoxyl-acetato (enzima non espresso da tutte e tre le specie confrontate), la mancata crescita su terreni addizionati con 1% di glicina (su cui, invece, crescono le altre specie considerate) e la sensibilità a acido nalidixico verso cui sono resistenti *H. marmotae* e *H. mastomyrinus* (tabella 9). Questi risultati hanno permesso di escludere che gli isolati appartenessero alle tre specie sopra menzionate, rendendo possibile l'ipotesi che si tratti di isolati del genere *Helicobacter* non appartenenti ad alcuna specie finora descritta. Questo possibile risultato preliminare, però, necessita di ulteriori e complessi approfondimenti: innanzi tutto sarebbe opportuno ampliare l'indagine filogenetica comparando le sequenze ottenute dall'amplificazione di altri geni, come il 23s rRNA, e indagando il grado di similarità del genoma con DNA-DNA *hybridization*, inoltre, si potrebbe ampliare lo spettro di prove biochimiche in modo da avere un numero maggiore di

dati da confrontare con quelli riportati in letteratura per le altre specie. Infine, una metodica che potrebbe dirimere i dubbi sull'identità dei ceppi da noi isolati è lo studio del profilo proteico, tecnica che, grazie alla collaborazione con il Prof. Peter Vandamme, responsabile del laboratorio di microbiologia dell'Università di Ghent (Belgio), è già stata utilizzata per la descrizione di nuove specie studiate presso il laboratorio di batteriologia del DIMEVET.

Per quanto concerne i risultati ottenuti dall'applicazione di sistemi di punteggio sulle sezioni osservate, a livello gastrico è stato confermato quanto ipotizzato alla sola osservazione da Fabisiak *et al.* (2010), ovvero la maggior presenza d'infiltrato infiammatorio a livello pilorico rispetto al corpo dello stomaco, dato che è stato confermato da entrambi i sistemi di valutazione utilizzati. Questo aspetto, però, non è emerso nello studio di Park *et al.* (2000), dove i punteggi maggiori erano assegnati alla porzione cardiaca. Sebbene nello studio presentato sia stato evidenziato un punteggio maggiore nel grado di flogosi a livello di corpo dello stomaco nei soggetti maschi, questo aspetto non è confermato nel lavoro di Park *et al.* (2004) dove non sono riportate differenze tra maschi e femmine nel grado di gastrite assegnato.

I risultati scaturiti dalle osservazioni di sezioni intestinali, invece, hanno mostrato con entrambi i sistemi di valutazione utilizzati, una maggior presenza d'infiltrato infiammatorio a livello di ileo, caratterizzato anche da maggior quantità di IEL e spessore della lamina propria della mucosa. Il maggior spessore della lamina propria dell'ileo potrebbe esser dovuto alla maggior quantità di cellule del sistema linfoide presenti in questa sede, dove si trova una placca di tessuto linfoide che occupa, nel suino, tutta la lunghezza dell'ileo stesso, misurando da 1,5 fino a 3,0 metri (Barone, 1981), nonostante durante le fasi di osservazione e assegnazione dei punteggi, con i due sistemi già menzionati, siano stati evitati i campi in cui le placche erano comprese.

Riguardo all'età, invece, i caratteri d'infiammazione di cieco e colon, così come la presenza di neutrofili a livello gastrico, sembrano più rappresentati nei soggetti più giovani. I soggetti di prima classe compresi in questo studio sono stati campionati dallo stesso luogo nello stesso giorno, trovandosi nella stessa gabbia di cattura, per cui è presumibile che facciano parte di una stessa figliata; in quest'ottica, questi dati potrebbero essere correlati ad altri fattori da noi non valutati, come un'infezione/infestazione comune ai tre soggetti. Un'altra ipotesi è che i risultati ottenuti siano collegati a fasi dello sviluppo del sistema immunitario, infatti, alcuni fattori come la produzione di citochine proinfiammatorie (IL-8 e TNF- α) e la funzionalità dell'attività neutrofila, cambiano durante la crescita. La produzione di citochine proinfiammatorie da parte di monociti e neutrofili, infatti, risulta inferiore nei soggetti neonati rispetto agli adulti, il cambiamento di queste funzioni avviene nella fase di svezzamento, fase in cui sono compresi i soggetti di classe 1 di questo studio (Zelnickova *et al.*, 2008).

Correlando i risultati scaturiti dall'indagine batteriologica a quelli emersi dall'osservazione macroscopica e istologica delle sezioni gastriche, in nessuno dei casi

esaminati sono stati riscontrati caratteri tipici di lesioni associate a batteri gram - spirillari, inoltre i microrganismi da noi isolati non hanno mostrato caratteristiche ascrivibili a quelle riportate per *Helicobacter suis*. Questo battere, infatti, è in grado di produrre ureasi, al contrario degli *Helicobacter* (NASD) isolati in questo studio, e annoverato per questo tra gli “*Helicobacter* gastrici”, inoltre sembra che possa intervenire sul pH gastrico favorendo l’iperproduzione di acido cloridrico, per questo rientra nelle cause che portano alla formazione di gastrite antrale e ulcere della *pars esophagea* (Haeseboruck *et al.*, 2009).

L’unico dato emerso dall’analisi statistica indica, nei soggetti positivi per *Helicobacter* NASD e *Campylobacter lanienae*, una correlazione con la presenza di eosinofili nella mucosa. Le cellule solitamente implicate nella risposta a microrganismi del genere *Helicobacter* spp nel suino sono linfociti, al contrario dell’uomo dove i neutrofili sembrano prevalere, indicando una risposta specie specifica alla colonizzazione batterica (Hellemans *et al.*, 2007). È però poco probabile che la maggior presenza di granulociti eosinofili nei soggetti positivi sia realmente collegata da una relazione di causa-effetto, ma sembra più plausibile che vi sia un terzo fattore da noi non considerato, che potrebbe spiegare entrambe le variabili. Ad esempio, la presenza di parassiti, da noi esclusi solo nelle forme macroscopicamente evidenti all’apertura dell’organo, potrebbe giustificare l’incremento di granulociti eosinofili, inoltre potrebbe ridurre le difese della barriera gastrica favorendo la proliferazione di microrganismi normalmente presenti in minori quantità, o generalmente localizzati a livello intestinale (come *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii*, *C. lanienae* e *H. bilis*). Non si possono escludere, però, anche reazioni immunopatologiche Ag-Ab indotte da proteine della dieta o reazioni a mediatori cellulari con liberazione di citochine chemotattiche per gli eosinofili da parte di linfociti mucosali attivati. Il secondo parametro associato alla presenza di batteri isolati nei casi esaminati è stato identificato nell’aumento di spessore degli strati di lamina propria e tonaca muscolare e si riferisce alla sola presenza di *Helicobacter* NASD. Anche in questo caso il dato non è facilmente spiegabile, ma è plausibile pensare che un terzo fattore sia responsabile della correlazione presentata. L’ipotetica presenza di una parassita dovrebbe quindi esser considerata qualora si voglia progettare un nuovo campionamento per indagare l’eventuale potenziale patogeno degli *Helicobacter* qui indicati come NASD nel cinghiale; diversi studi, infatti, dimostrano la sinergia che si può instaurare nel rapporto battere-parassita, come tra *C. jejuni* e *Trichuris suis* nel suino o *Helicobacter felis* e *Heligomoides polygyrus*, un nematode comunemente riscontrato nell’intestino dei roditori (Fox *et al.*, 2002b; Mansfield *et al.*, 2003).

ALLEGATI

PROTOCOLLO N° 1: ESTRAZIONE DNA da MUCOSA GASTRICA

RIFERIMENTI: “*Protocol-at-a-glance (Rev.10)*”, *User manual* – KIT commerciale Genomic DNA Purification from Tissue NucleoSpin®Tissue (Machery-Nagel)

MATERIALI e APPRECCHIATURE

Reagenti:

- KIT commerciale “Genomic DNA from Tissue – NucleoSpin®Tissue (Machery-Nagel)”
- Etanolo 96%-100%

Apparecchiature e strumenti:

- Micropipette e puntali con filtro DNA-RNA free
- *Eppendorf* sterili
- Termostato
- Microcentrifuga
- *Vortex*
- Bilancia di precisione
- Lame da bisturi sterili

PROTOCOLLO ESTRAZIONE

1. preparazione del campione: tagliare 25 mg di campione in piccoli frammenti.
2. pre-digestione del campione: in una *eppendorf* sterile miscelare 180 µl di T1, 25 µl di Proteinasi K e aggiungere il campione precedentemente sezionato. Incubare a 56°C per 1-3 h.
3. digestione del campione: aggiungere 200 µl di B3. Incubare a 70°C per 10 minuti.
4. condizioni favorevoli al legame del DNA: aggiungere al composto 210 µl di etanolo al 96-100%.
5. legame del DNA: Inserire il composto in colonnine dotate di membrana di silice (NucleoSpin®Tissue columns) inserite in tubi collettori da 2 ml (Collection tubes, in dotazione nel KIT). Centrifugare per 1 minuto a 11,000 rpm.
6. lavaggio della membrana di silice: eseguire due lavaggi successivi, il primo con 500 µl di Buffer BW, centrifugando poi a 11,000 rpm per un minuto; il secondo con 600 µl di Buffer B5, centrifugando per 1 minuto a 11,000 rpm. Tra i due lavaggi, e al termine del secondo, eliminare il materiale raccolto nel tubo collettore.
7. asciugatura della membrana di silice: centrifugare a 11,000 rpm per 1 minuto.
8. eluizione del DNA dalla membrana di silice: porre la colonnina in una *eppendorf* da 1,5 ml e aggiungere 100 µl di buffer BE pre-riscaldato a 70°C. Incubare a temperatura ambiente per 1 minuto e successivamente centrifugare a 11,000 rpm per un minuto. Eluire l'estratto in una *eppendorf* da 1,5 ml.
9. conservazione del DNA: conservare il DNA estratto a -20°C .

PROTOCOLLO N° 2: ESTRAZIONE DNA da PATINA BATTERICA

RIFERIMENTI: *Technical Bulletin* - KIT commerciale SIGMA REExtract-N-Amp™ Tissue PCR kit (SIGMA-Aldrich Inc).

MATERIALI e APPRECCHIATURE

Reagenti:

- KIT commercial SIGMA REExtract-N-Amp™ Tissue PCR kit

Apparecchiature e strumenti:

- Micropipette e puntali con filtro DNA-RNA free
- *Eppendorf* sterili
- Termostato
- Anse monouso sterili da 1 µl

PROTOCOLLO ESTRAZIONE

1. preparazione della soluzione: preparare in *un'eppendorf* sterile 100 µl di Extraction Solution e 25 µl di Tissue Preparation Solution.
2. inoculo del campione: prelevare un'ansata di patina batterica e scaricare il campione dentro la soluzione.
3. estrazione del DNA: incubare a temperatura ambiente per 10 minuti, poi a 95°C in termostato per 3 minuti.
4. arresto della reazione: aggiungere 100 µl di Neutralization Solution B e vortexare.
5. conservazione del DNA: conservare il DNA estratto a -20°C .

PROTOCOLLO N° 3: PCR GENERE *CAMPYLOBACTER*

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI: Linton *et al.*, 1996.

MATERIALI e APPARECCHIATURE:

Reagenti:

- REExtract-N-Amp PCR reaction mix (SIGMA)
- *Primer C412F* [5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3']
- *Primer C1288R* [5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3']
- H₂O deionizzata sterile
- Agar per elettroforesi
- *Syber Safe DNA gel stain* (INVITROGEN)
- TBE buffer 10 %
- DNA molecular weight marker XN (ROCHE)

Estratti DNA dei ceppi batterici usati come controlli:

- Controllo positivo: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 33560
- Controllo negativo: *Helicobacter pylori* CCUG17874 e H₂O deionizzata sterile

Apparecchiature e strumenti:

- Micropipette e puntali con filtro DNA-RNA free
- *Eppendorf* sterili
- Termociclatore
- Cella orizzontale per elettroforesi

PROTOCOLLO PCR:

1. diluzione dei primers: i *primers* sono utilizzati alla concentrazione di 20 pmol.
2. preparazione della mix di reazione: per 1 campione si miscelano, in una *eppendorf* sterile:
 - 10 µl REExtract-N-Amp PCR reaction mix
 - 1 µl C412-f
 - 1 µl C1228-r
 - 4 µl H₂O deionizzata
 - 4 µl di templato

Per un totale di 20 µl di soluzione.

3. protocollo di amplificazione:

- Denaturazione: 95°C x 5 minuti
- 25 cicli composti da
 - Denaturazione: 95°C x 30 secondi
 - Annealing: 58°C x 1 minuto e 30 secondi
 - Allungamento: 72°C x 1 minuto
- Estensione finale: 72°C x 7 minuti

ALLESTIMENTO DEL GEL e DELLA CORSA ELETTROFORETICA:

1. preparazione del gel per elettroforesi: in microonde solubilizzare la polvere di agarosio in TBE *buffer* ottenendo una soluzione finale al 1% di agarosio. Aggiungere *Syber Safe DNA gel stain* (1%), versare nello stampo e lasciar solidificare.
2. caricamento del gel e corsa elettroforetica: caricare 5 µl di *marker* e 10 µl di amplificato e relativi controlli nei pozzetti ed eseguire la corsa elettroforetica in TBE *buffer* a 100V per 30 minuti.
3. target: **816 bp** del gene 16s rRNA.

PROTOCOLLO N° 4:
MULTIPLEX PCR GENERE *CAMPYLOBACTER* e SPECIE-SPECIFICA per
C. JEJUNI*, *C. COLI* e *C. HYOINTESTINALIS* susp. *HYOINTESTINALIS

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI: Yamazaki-Matsune *et al.*, 2007 modificata.

MATERIALI e APPARECCHIATURE:

Reagenti:

- REExtract-N-Amp PCR reaction mix (SIGMA)
- *Primer* di genere C 412F [5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3']
- *Primer* di genere C1228R [5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3']
- *Primer C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* Hyo-1F [5'-ATAATCTAGGTGAGAATCCTAG-3']
- *Primer C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* Hyo-Fet 23SR [5'-GCTTCGCATAGCTAACAT-3']
- *Primer C. coli* CC18F [5'-GGTATGATTCTACAAAGCGAG-3']
- *Primer C. coli* CC519R [5'-ATAAAAGACTATCGTCCCGTG-3']
- *Primer C. jejuni* C1[5'-CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3']
- *Primer C. jejuni* C3[5'-CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3']
- H₂O deionizzata sterile
- Agar per elettroforesi
- *Sybr Safe DNA gel stain* (INVITROGEN)
- TBE *buffer* 10 %
- DNA molecular weight marker XN (ROCHE)

Estratti DNA dei ceppi batterici usati come controlli:

- Controllo positivo: *Campylobacter jejuni* ATCC 33560, *C. coli* ATCC33559 , *C. hyointestinalis* subsp *hyointestinalis* LMG 7538
- Controllo negativo: *Helicobacter pullorum* ATCC51801 e H₂O deionizzata sterile

Apparecchiature e strumenti:

- Micropipette e puntali con filtro DNA-RNA free
- *Eppendorf* sterili
- Termociclatore
- Cella orizzontale per elettroforesi

PROTOCOLLO PCR:

1. diluizione dei primers: i *primers* sono utilizzati alla concentrazione di 20 pmol.
2. preparazione della mix di reazione: per 1 campione si miscelano, in una *eppendorf* sterile:
 - 10 µl REExtract-N-Amp PCR reaction mix
 - 0,5 µl C 412F
 - 0,5 µl C1228R
 - 0,5 µl Hyo-1F
 - 0,5 µl Hyo-Fet23SR
 - 0,5 µl CC18F
 - 0,5 µl CC519R
 - 0,5 µl C1
 - 0,5 µl C3
 - 2 µl H₂O deionizzata
 - 4 µl DNA del campione

Per un totale di 20 µl di soluzione.

3. protocollo di amplificazione:

- Denaturazione: 95°C x 5 minuti
- 25 cicli composti da
 - Denaturazione: 95°C x 30 secondi
 - Annealing: 58°C x 1 minuto e 30 secondi
 - Allungamento: 72°C x 1 minuto
- Estensione finale: 72°C x 7 minuti

ALLESTIMENTO DEL GEL e DELLA CORSA ELETTROFORETICA:

1. preparazione del gel per elettroforesi: in microonde solubilizzare la polvere di agarosio in TBE *buffer* ottenendo una soluzione finale al 3% di agarosio. Aggiungere *Syber Safe DNA gel stain* (1%), versare nello stampo e lasciar solidificare.

2. caricamento del gel e corsa elettroforetica: caricare 5 µl di *marker* e 10 µl di amplificato e relativi controlli nei pozzetti ed eseguire la corsa elettroforetica in TBE *buffer* a 100V per 1h e 30 minuti.

3. target:

- Genere *Campylobacter*: **816 bp** del gene 16s rRNA
- *C. jejuni*: **161 bp** del gene 16s rRNA
- *C. coli*: **502 bp** del gene 16s rRNA
- *C. hyointestinalis* susbp. *hyointestinalis* **611 bp** del gene 16s rRNA

PROTOCOLLO N° 5: PCR GENERE *HELICOBACTER*

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI: Bohr *et al.*, 2002.

MATERIALI e APPARECCHIATURE:

Reagenti:

- REExtract-N-Amp PCR reaction mix (SIGMA)
- *Primer C 97-20* [5'-GGCTATGACGGGTATCCGGC-3']
- *Primer H3A-20* [5'-GCCGTGCAGCACCTGTTTTC-3']
- H₂O deionizzata sterile
- Agar per elettroforesi
- *Sybr Safe DNA gel stain* (INVITROGEN)
- TBE *buffer* 10 %
- DNA molecular weight marker XN (ROCHE)

Estratti DNA dei ceppi batterici usati come controlli:

- Controllo positivo: *Helicobacter pylori* CCUG17874
- Controllo negativo: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 33560 e H₂O deionizzata sterile

Apparecchiature e strumenti:

- Micropipette e puntali con filtro DNA-RNA free
- *Eppendorf* sterili
- Termociclatore
- Cella orizzontale per elettroforesi

PROTOCOLLO PCR:

1. diluizione dei primers: i *primers* sono utilizzati alla concentrazione di 50 pmol
2. preparazione della mix di reazione: per 1 campione si miscelano, in una *eppendorf* sterile:
 - 10 µl REExtract-N-Amp PCR reaction mix
 - 1 µl C97-20
 - 1 µl H3A-20
 - 4 µl H₂O deionizzata
 - 4 µl di templat

Per un totale di 20 µl di soluzione.

3. protocollo di amplificazione:

- Denaturazione: 94°C x 2 minuti
- 30 cicli composti da
 - Denaturazione: 94°C x 30 secondi
 - Annealing: 58°C x 30 secondi
 - Allungamento: 72°C x 30 secondi
- Estensione finale: 72°C x 4 minuti

ALLESTIMENTO DEL GEL e DELLA CORSA ELETTROFORETICA:

1. preparazione del gel per elettroforesi: in microonde solubilizzare la polvere di agarosio in TBE *buffer* ottenendo una soluzione finale al 1% di agarosio. Aggiungere *Syber Safe DNA gel stain* (1%), versare nello stampo e lasciar solidificare.
2. caricamento del gel e corsa elettroforetica: caricare 5 µl di *marker* e 10 µl di amplificato e relativi controlli nei pozzetti ed eseguire la corsa elettroforetica in TBE *buffer* a 100V per 30 minuti.
3. target: **764 bp** del gene 16s rRNA.

PROTOCOLLO N° 6: RFLP-PCR SPECIE-SPECIFICA per *HELICOBACTER BILIS*

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI: Rossi *et al.*, 2008

MATERIALI e APPARECCHIATURE:

Reagenti:

- REExtract-N-Amp PCR reaction mix (SIGMA)
- *Primer* HbilisF [5'-AATGGTGGCACACATGAAG-3']
- *Primer* HbilisR [5'-CGCAACCAAAGGCAGTAATC-3']
- H₂O deionizzata sterile
- Agar per elettroforesi
- *Sybr Safe* DNA gel stain (INVITROGEN)
- TBE buffer 10 %
- DNA molecular weight marker XN (ROCHE)
- Kit per Enzima HIND III (FERMENTAS)

Estratti DNA dei ceppi batterici usati come controlli:

- Controllo positivo: *Flexispira rappini* NCTC12461
- Controllo negativo: H₂O deionizzata sterile

Apparecchiature e strumenti:

- Micropipette e puntali con filtro DNA-RNA free
- *Eppendorf* sterili
- Termociclatore
- Cella orizzontale per elettroforesi

PROTOCOLLO PCR:

1. diluizione dei primers: i primers sono utilizzati alla concentrazione di 50 pmol

2. preparazione della mix di reazione: per 1 campione si miscelano, in una *eppendorf* sterile:

- 10 µl REExtract-N-Amp PCR reaction mix
- 1 µl HbilisF
- 1 µl HbilisR
- 4 µl H₂O deionizzata
- 4 µl di templat

Per un totale di 20 µl di soluzione.

3. protocollo di amplificazione:

- Denaturazione: 94°C x 5 minuti
- 40 cicli composti da
 - Denaturazione: 94°C x 30 secondi
 - Annealing: 60°C x 30 secondi
 - Allungamento: 72°C x 60 secondi
- Estensione finale: 72°C x 7 minuti

ALLESTIMENTO DEL GEL e DELLA CORSA ELETTROFORETICA:

1. preparazione del gel per elettroforesi: in microonde solubilizzare la polvere di agarosio in TBE *buffer* ottenendo una soluzione finale al 1% di agarosio. Aggiungere *Syber Safe DNA gel stain* (1%), versare nello stampo e lasciar solidificare.
2. caricamento del gel e corsa elettroforetica: caricare 5 µl di *marker* e 7 µl di amplificato e controlli nei pozzetti ed eseguire la corsa elettroforetica in TBE *buffer* a 100V per 30 minuti.
3. target: **600 bp** del gene *gyrB*.

RESTRIZIONE ENZIMATICA

1. preparazione della mix di reazione: per un campione si miscelano, in un'*eppendorf* sterile:
 - 10 µl PCR reaction mixture (DNA amplificato)
 - 1,5 µl Hind III
 - 2 µl *buffer* R
 - 6,5 µl H₂O deionizzata

Per un totale di 20 µl di soluzione.

2. digestione: incubazione a 37°C per 90 minuti.

ALLESTIMENTO DEL GEL e DELLA CORSA ELETTROFORETICA:

1. preparazione del gel per elettroforesi: in microonde solubilizzare la polvere di agarosio in TBE *buffer* ottenendo una soluzione finale al 4% di agarosio. Aggiungere *Syber Safe DNA gel stain* (1%), versare nello stampo e lasciar solidificare.
2. caricamento del gel e corsa elettroforetica: caricare 10 µl di digerito, 5µl di *marker* e controllo positivo in ogni pozzetto ed eseguire la corsa elettroforetica in TBE *buffer* a 100V per 1 ora e 30 minuti.
3. pattern di restrizione: **324, 224 e 52 bp** del gene *gyrB*.

PROTOCOLLO N° 7: PCR 16s rRNA GENERICO

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI: Brosius *et al.*, 1978.

MATERIALI e APPARECCHIATURE:

Reagenti:

- REDExtract-N-Amp PCR reaction mix (SIGMA)
- *Primer* 27f [5'-AGAGTTTGATCCTGGCTAG-3']
- *Primer* 1492 [5'-TACGGCTACCTTGTACGACT -3']
- H₂O deionizzata sterile
- Agar per elettroforesi
- *Sybr Safe* DNA gel stain (INVITROGEN)
- TBE *buffer* 10 %
- DNA molecular weight marker XN (ROCHE)

Estratti DNA dei ceppi batterici usati come controlli:

- Controllo positivo: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 33560
- Controllo negativo: H₂O deionizzata sterile

Apparecchiature e strumenti:

- Micropipette e puntali sterili
- *Eppendorf* sterili
- Termociclatore
- Cella orizzontale per elettroforesi

PROTOCOLLO PCR:

1. diluizione dei primers: i *primers* sono utilizzati alla concentrazione di 25 pmol

2. preparazione della mix di reazione: per 1 campione si miscelano, in una *eppendorf* sterile:

- 10 µl REDExtract-N-Amp PCR reaction mix
- 1 µl 27f
- 1 µl 1492
- 4 µl H₂O deionizzata
- 4 µl di templat

Per un totale di 20 µl di soluzione.

3. protocollo di amplificazione:

- Denaturazione: 94°C x 5 minuti
- 35 cicli composti da
 - Denaturazione: 93°C x 1 minuto
 - Annealing: 54°C x 2 minuti
 - Allungamento: 72°C x 3 minuti
- Estensione finale: 72°C x 7 minuti

ALLESTIMENTO DEL GEL e DELLA CORSA ELETTROFORETICA:

1. preparazione del gel per elettroforesi: in microonde solubilizzare la polvere di agarosio in TBE *buffer* ottenendo una soluzione finale al 1% di agarosio. Aggiungere *Syber Safe* DNA gel stain (1%), versare nello stampo e lasciar solidificare.

2. caricamento del gel e corsa elettroforetica: caricare 5 µl di *marker* e 10 µl di amplificato e relativi controlli nei pozzetti ed eseguire la corsa elettroforetica in TBE *buffer* a 100V per 30 minuti.

3. target: 833 bp del gene 16s rRNA.

PROTOCOLLO N°8: PCR 16s rRNA di *HELICOBACTER* spp.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI: Shen *et al.*, 2005**MATERIALI e APPARECCHIATURE:**

Reagenti:

- REExtract-N-Amp PCR reaction mix (SIGMA)
- *Primer* C97 [5'-GCT ATG ACG GGT ATCC-3']
- *Primer* C05 [5'-ACT TCA CCC CAG TCG CTG-3']
- H₂O deionizzata sterile
- Agar per elettroforesi
- *Sybr Safe* DNA gel stain (INVITROGEN)
- TBE *buffer* 10 %
- DNA molecular weight marker XN (ROCHE)

Estratti DNA dei ceppi batterici usati come controlli:

- Controllo positivo: *Helicobacter pylori* CCUG 17874 o qualsiasi altro ceppo di *Helicobacter* di riferimento.
- Controllo negativo: H₂O deionizzata sterile

Apparecchiature e strumenti:

- Micropipette e puntali con filtro DNA-RNA free
- *Eppendorf* sterili
- Termociclatore
- Cella orizzontale per elettroforesi

PROTOCOLLO PCR:

1. diluizione dei primers: i *primers* sono utilizzati alla concentrazione di 50 pmol
2. preparazione della mix di reazione: per 1 campione si miscelano, in una *eppendorf* sterile:
 - 10 µl REExtract-N-Amp PCR reaction mix
 - 1 µl C97
 - 1 µl C05
 - 4 µl H₂O deionizzata
 - 4 µl di templat

Per un totale di 20 µl di soluzione.

3. protocollo di amplificazione:
 - 35 cicli composti da
 - Denaturazione: 94°C x 1 minuto
 - Annealing: 58°C x 2 minuti
 - Allungamento: 72°C x 3 minuti
 - Estensione finale: 72°C x 7 minuti

ALLESTIMENTO DEL GEL e DELLA CORSA ELETTROFORETICA:

1. preparazione del gel per elettroforesi: in microonde solubilizzare la polvere di agarosio in TBE *buffer* ottenendo una soluzione finale al 1% di agarosio. Aggiungere *Syber Safe* DNA gel stain (1%), versare nello stampo e lasciar solidificare.
2. caricamento del gel e corsa elettroforetica: caricare 5 µl di *marker* e 10 µl di amplificato e relativi controlli nei pozzetti ed eseguire la corsa elettroforetica in TBE *buffer* a 100V per 30 minuti.
3. target: **1200 bp** del gene 16s rRNA.

PROTOCOLLO N° 9: PCR SPECIE-SCPECIFICA per *HELICOBACTER MASTOMYRINUS*

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI: Shen *et al.*, 2005

MATERIALI e APPARECCHIATURE:

Reagenti:

- REExtract-N-Amp PCR reaction mix (SIGMA)
- *Primer C 60* [5'-AGAACTGCATTTGAACTATGAG-3']
- *Primer C 61* [5'-CAGTATTGCGTCTCTTTGTA-3']
- H₂O deionizzata sterile
- Agar per elettroforesi
- *Syber Safe DNA gel stain* (INVITROGEN)
- TBE *buffer* 10 %
- DNA molecular weight marker XN (ROCHE)

Estratti DNA dei ceppi batterici usati come controlli:

- Controllo positivo: non disponibile.
- Controllo negativo: H₂O deionizzata sterile, *H. pullorum* ATCC51801

Apparecchiature e strumenti:

- Micropipette e puntali con filtro DNA-RNA free
- *Eppendorf* sterili
- Termociclatore
- Cella orizzontale per elettroforesi

PROTOCOLLO PCR:

1. diluizione dei primers: i *primers* sono utilizzati alla concentrazione di 50 pmol
2. preparazione della mix di reazione: per 1 campione si miscelano, in una *eppendorf* sterile:

- 10 µl REExtract-N-Amp PCR reaction mix
- 1 µl C 60
- 1 µl C 61
- 4 µl H₂O deionizzata
- 4 µl di template

Per un totale di 20 µl di soluzione.

3. protocollo di amplificazione:

- 35 cicli composti da
 - Denaturazione: 94°C x 1 minuto
 - Annealing: 58°C x 1 minuto e 30 secondi
 - Allungamento: 72°C x 2 minuti
- Estensione finale: 72°C x 7 minuti

ALLESTIMENTO DEL GEL e DELLA CORSA ELETTROFORETICA:

1. preparazione del gel per elettroforesi: in microonde solubilizzare la polvere di agarosio in TBE *buffer* ottenendo una soluzione finale al 1% di agarosio. Aggiungere *Syber Safe DNA gel stain* (1%), versare nello stampo e lasciar solidificare.
2. caricamento del gel e corsa elettroforetica: caricare 5 µl di *marker* e 10 µl di amplificato e relativi controlli nei pozzetti ed eseguire la corsa elettroforetica in TBE *buffer* a 100V per 30 minuti.
3. target: **639 bp** del gene 16s rRNA.

PROTOCOLLO N° 10: PCR SPECIE-SCPECIFICA per *HELICOBACTER SUIS*

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI: De Groote *et al.*, 2000**MATERIALI e APPARECCHIATURE:**

Reagenti:

- REExtract-N-Amp PCR reaction mix (SIGMA)
- *Primer V832f* [5'-TTGGGAGGCTTTGTCTTTCCA-3']
- *Primer V126r* [5'-GATTAGCTCTGCCTCGCGGCT-3']
- H₂O deionizzata sterile
- Agar per elettroforesi
- *Sybr Safe DNA gel stain* (INVITROGEN)
- TBE *buffer* 10 %
- DNA molecular weight marker XN (ROCHE)

Estratti DNA dei ceppi batterici usati come controlli:

- Controllo positivo: *Helicobacter suis* HS1 LMG 23995
- Controllo negativo: *Helicobacter pullorum* ATCC51801 e H₂O deionizzata sterile

Apparecchiature e strumenti:

- Micropipette e puntali con filtro DNA-RNA free
- *Eppendorf* sterili
- Termociclatore
- Cella orizzontale per elettroforesi

PROTOCOLLO PCR:

1. diluizione dei primers: i *primers* sono utilizzati alla concentrazione di 25 pmol
2. preparazione della mix di reazione: per 1 campione si miscelano, in una *eppendorf* sterile:
 - 10 µl REExtract-N-Amp PCR reaction mix
 - 1 µl V832f
 - 1 µl V126r
 - 4 µl H₂O deionizzata
 - 4 µl di templat

Per un totale di 20 µl di soluzione.

3. protocollo di amplificazione:
 - Denaturazione: 94°C x 5 minuti
 - 40 cicli composti da
 - Denaturazione: 94°C x 30 secondi
 - Annealing: 60°C x 30 secondi
 - Allungamento: 72°C x 45 secondi
 - Estensione finale: 72°C x 5 minuti

ALLESTIMENTO DEL GEL e DELLA CORSA ELETTROFORETICA:

1. preparazione del gel per elettroforesi: in microonde solubilizzare la polvere di agarosio in TBE *buffer* ottenendo una soluzione finale al 2% di agarosio. Aggiungere *Syber Safe DNA gel stain* (1%), versare nello stampo e lasciar solidificare.
2. caricamento del gel e corsa elettroforetica: caricare 5 µl di *marker* e 10 µl di amplificato e relativi controlli nei pozzetti ed eseguire la corsa elettroforetica in TBE *buffer* a 100V per 30 minuti.
3. target: **433 bp** del gene 16s rRNA.

PROTOCOLLO N° 11: PCR GENE UreAB

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI: O'Rourke *et al.*, 2004

MATERIALI e APPARECCHIATURE:

Reagenti:

- REExtract-N-Amp PCR reaction mix (SIGMA)
- Primer U430f [5'-GCKGAWTTGATGCAAGAAGG-3']
- Primer U1735r [5'-CTTCGTGRATTTTAARRCCAAT-3']
- H₂O deionizzata sterile
- Agar per elettroforesi
- *Sybr Safe* DNA gel stain (INVITROGEN)
- TBE buffer 10 %
- DNA molecular weight marker XN (ROCHE)

Estratti DNA dei ceppi batterici usati come controlli:

- Controllo positivo: *Helicobacter pylori* CCUG 17874 e *Helicobacter pullorum* ATCC 51801
- Controllo negativo: e H₂O deionizzata sterile

Apparecchiature e strumenti:

- Micropipette e puntali con filtro DNA-RNA free
- *Eppendorf* sterili
- Termociclatore
- Cella orizzontale per elettroforesi

PROTOCOLLO PCR:

1. diluizione dei primers: i primers sono utilizzati alla concentrazione di 20 pmol
2. preparazione della mix di reazione: per 1 campione si miscelano, in una *eppendorf* sterile:
 - 10 µl REExtract-N-Amp PCR reaction mix
 - 1 µl U430f
 - 1 µl U1735r
 - 4 µl H₂O deionizzata
 - 4 µl di templat

Per un totale di 20 µl di soluzione.

3. protocollo di amplificazione:

- Denaturazione: 94°C x 3 minuti
- 35 cicli composti da
 - Denaturazione: 94°C x 10 secondi
 - Annealing: 54°C x 30 secondi
 - Allungamento: 72°C x 1 minuto e 30 secondi
- Estensione finale: 72°C x 5 minuti

ALLESTIMENTO DEL GEL e DELLA CORSA ELETTROFORETICA:

1. preparazione del gel per elettroforesi: in microonde solubilizzare la polvere di agarosio in TBE buffer ottenendo una soluzione finale al 1% di agarosio. Aggiungere *Syber Safe* DNA gel stain (1%), versare nello stampo e lasciar solidificare.
2. caricamento del gel e corsa elettroforetica: caricare 5 µl di marker e 10 µl di amplificato e relativi controlli nei pozzetti ed eseguire la corsa elettroforetica in TBE buffer a 100V per 30 minuti.
3. target: 1224 bp del gene UreAB.

PROTOCOLLO N° 12: PCR GENE Hsp60

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI: Mikkonen *et al.*, 2004

MATERIALI e APPARECCHIATURE:

Reagenti:

- REExtract-N-Amp PCR reaction mix (SIGMA)
- *Primer H60F* [5'-GGNGAYGGNCANCANCANGCNCANGT-3']
- *Primer H60R* [5'—TCNCCRAANCCNGGNGCYTTNCANGC-3']
- H₂O deionizzata sterile
- Agar per elettroforesi
- *Sybr Safe DNA gel stain* (INVITROGEN)
- TBE *buffer* 10 %
- DNA molecular weight marker XN (ROCHE)

Estratti DNA dei ceppi batterici usati come controlli:

- Controllo positivo: *Helicobacter pylori* CCUG 17874 e *Helicobacter pullorum* ATCC 51801
- Controllo negativo: e H₂O deionizzata sterile

Apparecchiature e strumenti:

- Micropipette e puntali sterili
- *Eppendorf* sterili
- Termociclatore
- Cella orizzontale per elettroforesi

PROTOCOLLO PCR:

1. diluizione dei primers: i *primers* sono utilizzati alla concentrazione di 100 pmol (tal quali).
2. preparazione della mix di reazione: per 1 campione si miscelano, in una *eppendorf* sterile:
 - 10 µl REExtract-N-Amp PCR reaction mix
 - 1 µl H60F
 - 1 µl H60R
 - 4 µl H₂O deionizzata
 - 4 µl di templato

Per un totale di 20 µl di soluzione.

3. protocollo di amplificazione:

- Denaturazione: 94°C x 5 minuti
- 30 cicli composti da
 - Denaturazione: 94°C x 30 secondi
 - Annealing: 55°C x 30 secondi
 - Allungamento: 72°C x 1 minuto
- Estensione finale: 72°C x 10 minuti

ALLESTIMENTO DEL GEL e DELLA CORSA ELETTROFORETICA:

1. preparazione del gel per elettroforesi: in microonde solubilizzare la polvere di agarosio in TBE *buffer* ottenendo una soluzione finale al 1% di agarosio. Aggiungere *Syber Safe DNA gel stain* (1%), versare nello stampo e lasciar solidificare.
2. caricamento del gel e corsa elettroforetica: caricare 5 µl di *marker* e 10 µl di amplificato e relativi controlli nei pozzetti ed eseguire la corsa elettroforetica in TBE *buffer* a 100V per 30 minuti.
3. target: **590 bp** del gene Hsp60.

Capitolo 8

MONITORAGGIO DELL'ANTIBIOTICORESISTENZA DI INDICATORI FECALI IN UNA METAPOPOLAZIONE DI CINGHIALI

8.1 Introduzione

Come descritto nella parte compilativa della presente tesi (capitolo 4), l'inquinamento ambientale da farmaci e l'antropizzazione hanno portato allo sviluppo di indagini sulla manifestazione dell'antibioticoresistenza in indicatori fecali della fauna selvatica, per monitorare gli effetti di questi fenomeni sull'ambiente naturale.

Questo tipo d'indagine, già condotta presso lo stesso laboratorio negli anni 2002-2004 su una popolazione più ampia di cinghiali (Rossi *et al.*, 2007) del Parco dei Gessi Bolognesi, è stata applicata a indicatori fecali isolati da soggetti campionati all'interno del progetto finalizzato all'isolamento e identificazione di batteri spirillari gram negativi da contenuto gastrico e ciecale di cinghiale (capitolo 7).

L'idea di approfondire la tematica anche su questa casistica è scaturita dall'ipotesi che, nell'arco dei dieci passati dal primo studio, alcuni fattori connessi a tematiche d'inquinamento ambientale da farmaci o antropizzazione potessero aver modificato lo spettro di resistenze espresso dagli indicatori fecali. A questo proposito, quindi, sono state applicate le stesse procedure descritte nel lavoro condotto negli anni 2002-2004, per poi confrontare i risultati ottenuti. Per questi motivi, quindi, si è proceduto all'isolamento e identificazione di ceppi di indicatori fecali da contenuto ciecale di 21 cinghiali campionati che sono, poi, stati testati come da protocolli definiti riportati nella sezione allegati del presente capitolo; inoltre, sempre a fini comparativi con il lavoro svolto negli anni 2002-2004, è stata indagata la presenza di *Salmonella* spp. nei campioni ricevuti.

In aggiunta, dati i risultati emersi dalla ricerca di *Campylobacter* spp. da contenuto ciecale (riportati nel capitolo 7 di questa tesi), dove è stato isolato *C. lanienae* in 20/21 soggetti campionati, è sembrato opportuno estendere le prove di sensibilità agli antibiotici anche a questa specie, nell'ottica di definire un eventuale "resistotipo" in un battere largamente diffuso nella popolazione campionata, che potesse eventualmente fornire alcune indicazioni aggiuntive al lavoro svolto. Per questo gli isolati appartenenti alla specie *C. lanienae*, almeno uno per ogni soggetto positivo (identificati con ID dell'animale di provenienza), sono stati sottoposti a indagine per rilevare la concentrazione minima inibente (MIC) di alcuni farmaci selezionati in base al loro uso in medicina umana e veterinaria.

8.2 Materiali e Metodi

8.2.1 CAMPIONAMENTO

Dai 21 soggetti campionati per lo studio sulla ricerca dei microrganismi spirillari gram negativi è stata prelevata un'aliquota di circa 10 g contenuto ciecale per procedere all'isolamento di *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*. Il campione è stato prelevato durante le fasi di campionamento di contenuto ciecale per la ricerca di batteri spirillari gram negativi (capitolo 7), e posto in un contenitore sterile che è stato immediatamente conferito al Laboratorio di Batteriologia del DIMEVET.

8.2.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI *ESCHERICHIA COLI* DA CONTENUTO CIECALE

Le feci prelevate sono state sottoposte a diluizioni seriali in base 10 (1:10; 1:100; 1:1000) in soluzione fisiologica sterile e 0,1 ml di ogni diluizione è stato seminato per spatolamento su tre piastre di terreno selettivo McConkey Agar (Becton Dickinson) e incubate a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ per 24 ore. La produttività e selettività del terreno sono state saggiate con controllo positivo *Escherichia coli* ATCC 25922 e negativo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Dalle piastre con diluizione ottimale, nelle quali erano presenti colonie ben isolate ascrivibili a *E. coli*, sono state identificate almeno 8 colonie, che sono state trapiantate su Tryptone Soya Agar (Oxoid) e reincubate. Gli isolati ottenuti sono stati successivamente identificati mediante prove biochimiche (IMViC). Per ogni soggetto almeno due ceppi identificati come *E. coli* venivano conservati in Tryptone Soya Broth (Oxoid) addizionato al 20% di glicerolo.

8.2.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI *ENTEROCOCCUS FAECIUM* E *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Da ogni diluizione effettuata per la ricerca di *E. coli*, veniva seminato per spatolamento 0,1 ml di sospensione su piastre di terreno selettivo per *Enterococchi* spp. Bile Aesculin Azide Agar (BEAA – Becton Dickinson). I controlli positivo e negativo usati per saggiare la produttività e selettività del terreno erano rispettivamente *E. faecalis* ATCC 19433 e *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. Una volta incubate le piastre a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ per almeno 72 ore, da ogni diluizione ottimale venivano trapiantate almeno 10 colonie ascrivibili al genere *Enterococcus* spp. su Brain Heart Infusion Agar (BHI – Difco) e sottoposte a identificazione fenotipica mediante sistema in micrometodo Rapid ID 32 Strep (BIOMÉRIEAUX) attenendosi alle indicazioni della ditta produttrice; la lettura delle prove è stata registrata su apposite schede e l'interpretazione dei profili numerici è stata condotta con il programma APILAB PLUS (BIOMÉRIEAUX).

Gli isolati fenotipicamente identificati come *E. faecium* e *E. faecalis*, almeno due per ogni soggetto campionato, venivano sottoposti a estrazione di DNA e PCR come da protocolli n° 1 e n° 2 in allegato al presente capitolo.

8.2.4 ISOLAMENTO DI *SALMONELLA* SPP.

Per la ricerca di *Salmonella* spp. da ogni soggetto venivano analizzati 5 g di contenuto ciecale seguendo pedissequamente le indicazioni fornite da ISO-6579:2002 e utilizzando come arricchimenti Muller-Kauffmann Tetrathionate Broth Base (BD - Becton Dickinson) addizionato di iodina e verde brillante, e Rappaport Vassiliadis soy peptone (RVS) broth (Oxoid) e come terreni selettivi di coltura il Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar (Oxoid) e il Brilliant Green agar (BGA) (Oxoid).

Il controllo qualità dei terreni è stato eseguito con controllo positivo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e negativo *E. coli* ATCC 25922.

8.2.5 ALLESTIMENTO DEGLI ANTIBIOGRAMMI

Per ogni animale risultato positivo è stato selezionato un ceppo di *E. coli*, *E. faecium* e *E. faecalis* da sottoporre a prova di sensibilità secondo la tecnica di diffusione in agar (metodo Kirby-Bauer) seguendo pedissequamente le indicazioni fornite dal CLSI (2008). Brevemente, l'inoculo è stato preparato in soluzione fisiologica con torbidità pari a 0,5 della scala di McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ u.f.c./ml). Con un tampone sterile imbibito d'inoculo sono state seminate uniformemente sulla superficie piastre di Mueller Hinton Agar (BBL-Becton Dickinson). I dischetti di antibiotico (BBL-Becton Dickinson) sono, infine, stati depositati sulla superficie del terreno avendo cura di mantenere una distanza di almeno 2,5 cm tra dischetti contigui. Le piastre così preparate sono state incubate a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ per 16-18 ore. Per saggiare la sensibilità degli *Enterococchi* spp. alla vancomicina la lettura veniva eseguita a 24, ovvero dopo una prima lettura degli aloni d'inibizione degli altri farmaci a 16-18 ore, le piastre venivano re incubate. Le molecole testate per entrambi i generi batterici sono riportate in tabella 16. Il controllo di qualità è stato condotto con i ceppi *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29212.

Per ogni test i risultati sono stati registrati su schede e comparati con i valori riportati dalle linee guida del CLSI (2008).

Tabella 16: elenco degli antibiotici testati nelle specie batteriche considerate.

*in pedice alla sigla viene indicata la concentrazione del farmaco nel dischetto (μm).

ANTIBIOTICI TESTATI			
<i>Escherichia coli</i>		<i>Enterococcus faecium</i> e <i>E. faecalis</i> .	
<i>molecola</i>	<i>Sigla*</i>	<i>Molecola</i>	<i>Sigla*</i>
Ampicillina	AM ₁₀	Ampicillina	AM ₁₀
Amikacina	AN ₃₀	Ciprofloxacina	CIP ₅
Cefazolina	CZ ₃₀	Eritromicina	E ₁₅
Kanamicina	K ₃₀	Penicillina	P ₁₀
Spectinomina	SPT ₁₀₀	Spectinomina	SPT ₁₀₀
Sulfisoxazolo	G ₂₅	Teicoplanina	TEC ₃₀
Trimethoprim/Sulfamethoxazolo	SXT _{1.25/23.75}	Rifampicina	RA ₅
Enrofloxacin	ENO ₅	Vancomicina	Va ₃₀
Tetraciclina	TE ₃₀	Tetraciclina	TE ₃₀
Colistina	CL ₁₀	Tilmicosina	TIL ₁₅
Acido nalidixico	NA ₃₀	Cloramfenicolo	C ₃₀
Cefotaxime	CTX ₃₀	Gentamicina	GM ₁₂₀
Amoxicillina/acido clavulanico	AmC ₃₀	Streptomina	S ₃₀₀
Cloramfenicolo	C ₃₀		
Gentamicina	Gm ₁₀		
Streptomina	S ₁₀		

8.2.6 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC) PER 7 DIVERSE MOLECOLE DI ANTIBIOTICI NEI CONFRONTI DI ISOLATI DI *CAMPYLOBACTER LANIENAE*

Da ogni animale positivo per *C. lanienae* (capitolo 7) è stato selezionato un isolato su cui testare la sensibilità e resistenza alle seguenti molecole di antibiotici: ampicillina (AM), gentamicina (GM), trimethoprim/sulfamethoxazolo (SXT), azitromicina (AZ), cloramfenicolo (CL), eritromicina (EM) e tetraciclina (TC) e ciprofloxacina (CI). Per tutte le molecole i test sono stati condotti su terreno agarizzato con sistema commerciale E-test[®] (BIOMÉRIEUX).

Il sistema E-test[®] costituisce una combinazione tra due differenti metodi di valutazione della sensibilità dei batteri agli antibiotici: il metodo semiquantitativo secondo Kirby-Bauer, ovvero quello che si avvale di dischetti di antibiotico che diffondono in terreno agarizzato, e la tecnica quantitativa di determinazione delle MIC in agar, in cui l'antibiotico è diluito nel terreno di coltura agarizzato. Infatti, il saggio con E-test[®] viene svolto su terreno agarizzato con un meccanismo di diffusione dell'antibiotico da un supporto inerte, ma sul supporto (striscia di plastica di 50 mm) l'antibiotico è distribuito in concentrazioni scalari da un'estremità all'altra. In questo modo nel punto in cui la crescita batterica interseca la striscia si può leggere la concentrazione del farmaco grazie alla presenza di una scala graduata di valori espressi in $\mu\text{g/ml}$ sulla faccia superiore della

striscia stessa. La gamma di concentrazioni corrisponde a 15 diluizioni per raddoppio usate nei metodi convenzionali di determinazione della MIC.

Nelle molecole testate in questa sezione il *range* di valori di MIC valutati si estendeva da 0,016 a 256 µg/ml per ampicillina, gentamicina, azitromicina, cloramfenicolo, eritromicina e tetraciclina, mentre variava da 0,002 a 32 µg/ml per trimethoprim/sulfamethoxazolo e ciprofloxacina. Gli isolati testati provenivano tutti da colture eseguite su Nutrient Agar (Oxoid) addizionato al 5% di sangue ovino defibrinato incubate per 48 ore in microaerofilia a 37±1 °C. Da queste colture è stata allestita per ciascun isolato una sospensione in acqua fisiologica con opacità pari al valore 0,5 della scala di McFarland (~ 1,5x10⁸ u.f.c./ml) che è stata seminata omogeneamente con tampone sterile sulla superficie su una piastra di Nutrient Agar (Oxoid) addizionato al 5% di sangue defibrinato ovino, lasciando asciugare almeno 5 minuti prima di posizionare le strisce di E-test® in numero massimo di due per piastra. Le piastre sono, poi, state incubate in microaerofilia a 37±1°C e le letture sono state condotte a 48 ore dall'incubazione.

Per l'allestimento della prova con la molecola trimethoprim/sulfamethoxazolo (SXT) l'inoculo è stato seminato su piastre di Nutrient Agar (Oxoid) addizionato al 5% di sangue laccato equino (Oxoid).

I controlli qualità sono stati allestiti usando i ceppi di riferimento *C. jejuni* ATCC 33560 e *E. coli* ATCC 25922.

La lettura delle prove è stata eseguita definendo il valore nel punto in cui il margine dell'ellisse dell'alone d'inibizione intersecava la striscia contenente antibiotico. I valori registrati, qualora intermedi rispetto ai valori di MIC comunemente utilizzati, venivano aggiustati al valore di MIC immediatamente superiore a quello ottenuto.

Per *Campylobacter* spp. i valori di *breakpoint* riportati sono quelli utilizzati dal NARMS come riportato da US Centre for Disease Control NARMS 2010 Annual Report for *Campylobacter* spp. per cloramfenicolo, ciprofloxacina, azitromicina e tetraciclina, mentre per ampicillina, eritromicina e gentamicina i valori di *breakpoint* sono stati estrapolati da quanto riportato dal CLSI (2008). Di seguito i valori di *breakpoint* per ogni antibiotico testato: ampicillina ≥ 32 µg/ml; gentamicina ≥ 8 µg/ml; trimethoprim/sulfamethoxazolo ≥ 2/38 µg/ml; azitromicina ≥ 8 µg/ml; cloramfenicolo ≥ 32 µg/ml; eritromicina ≥ 32 µg/ml; tetraciclina ≥ 16 µg/ml e ciprofloxacina ≥ 4 µg/ml. I valori di *breakpoint* forniti da EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2013) per *Campylobacter jejuni* e *C. coli* si presentano differenti, con valori di MIC inferiori per tetraciclina R > 2; ciprofloxacina R > 0,5 e eritromicina con R > 4 (*C. jejuni*) e R > 8 (*C. coli*). Secondo i valori forniti dall'EUCAST, inoltre, i *breakpoint* per azitromicina possono essere ricavati da quelli considerati per l'eritromicina.

8.3 Risultati

8.3.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI *ESCHERICHIA COLI*, *ENTEROCOCCUS FAECIUM* E *E. FAECALIS* E *SALMONELLA* SPP..

Da tutti i soggetti campionati è stato possibile isolare *Escherichia coli*, mentre da soli 10 cinghiali (ID 3,4,8,9,15, 16, 17, 18, 19, 21) è stato isolato *Enterococcus faecium*. In nessun caso campionato è stato possibile isolare *Enterococcus faecalis*. Gli isolati del genere *Enterococcus*, una volta estratto il DNA da patina batterica (protocollo n° 1 in allegato al capitolo) sono stati testati con PCR specifica (protocollo n° 2). Nessuno dei campioni testati ha dato esito positivo per isolamento di *Salmonella* spp.

8.3.2 ESITO DEGLI ANTIBIOGRAMMI EFFETTUATI SU ISOLATI DI *ESCHERICHIA COLI* E *ENTEROCOCCUS FAECIUM*

I dati relativi alle letture degli antibiogrammi eseguiti su isolati di *Escherichia coli* sono riassunti in tabella 17, mentre quelli relativi alla specie *Enterococcus faecium* sono riportati in tabella 18.

Per quanto riguarda gli isolati di *Escherichia coli*, solo due di quelli testati hanno mostrato resistenza verso almeno una molecola (ID 4 e 21), in un caso le resistenze erano verso tre delle molecole testate (ID 4). 19 isolati dei 21 testati, inoltre, presentavano un alone d'inibizione con valore intermedio verso la Streptomicina (S₁₀), un solo ceppo si è mostrato sensibile a questa molecola, mentre un altro (ID 4) era resistente. Altri valori intermedi sono stati ottenuti in sei casi (ID 12, 14, 17, 18, 20, 22), di cui uno per il Sulfisoxazolo (G₃₀), due per la Tetraciclina (TE₃₀) e tre per la Kanamicina (K₃₀). Solo in un caso (ID 4), quindi, è stato evidenziato un ceppo con resistenza multipla, ovvero con resistenza a 3 o più molecole di antibiotici non correlati tra loro.

Dei 10 ceppi valutati di *Enterococcus faecium*, 8 si sono rivelati resistenti ad almeno una molecola, di cui 3 resistenti ad una sola molecola (ID 9, 17 e 21), 4 resistenti a due molecole contemporaneamente (ID 3, 4, 15, 16), ovvero Ciprofloxacina (CIP₅) e Rifampicina (RA₅), mentre un isolato (ID 19) ha dato valori di resistenza in 7 delle 13 molecole testate: Ciprofloxacina (CIP₅), Eritromicina (E₁₅), Tetraciclina (TE₃₀), Rifampicina (RA₅), Tilmicosina (TIL₁₅), Streptomicina (S₃₀₀) e Spectinomicina (SPT₁₀₀). Valori intermedi sono risultati in 8 soggetti (ID 4, 8, 9, 15, 16, 17, 18 e 21), limitati a Ciprofloxacina (CIP₅), Eritromicina (E₁₅) e Rifampicina (RA₅). Nessuno degli isolati testati, infine, si è mostrato sensibile alla Ciprofloxacina (CIP₅).

Tabella 17: risultato degli antibiogrammi eseguiti sugli isolati di *Escherichia coli*. Il numero del ceppo si riferisce al ID del cinghiale da cui è stato isolato. I risultati sono riportati come S (sensibile), I (intermedio) e R (resistente). AmC₃₀: Amoxiciclina e acido clavulanico; AM₁₀: ampicillina; AN₃₀: amikacina; C₃₀: cloramfenicolo; CTX₃₀: cefotaxime; CZ₃₀: cefazolina; CL₁₀: colistina; ENO₅: enrofloxacin; G₂₅: sulfisoxazolo; GM₁₀: gentamicina; K₃₀: kanamicina; NA₃₀: acido nalidixico; S₁₀: streptomina; SXT_{1.25-23.75}: Trimethoprim-sulfamethoxazolo; Te₃₀: tetraciclina. I numeri in pedice si riferiscono alla concentrazione del farmaco nel dischetto.

Numero o ceppo	AmC ₃₀	AM ₁₀	AN ₃₀	C ₃₀	CTX ₃₀	CZ ₃₀	CL ₁₀	ENO ₅	G ₂₅	GM ₁₀	K ₃₀	NA ₃₀	S ₁₀	SPT ₁₀₀	SXT _{1.25-23.75}	TE ₃₀
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I
13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
14	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	I	S	S	S
15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S
18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I
19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S
21	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S
22	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S

Tabella 18: risultati degli antibiogrammi eseguiti su isolati di *Enterococcus faecium*. Il numero del ceppo si riferisce al ID del cinghiale da cui è stato isolato. I risultati sono riportati come S (sensibile), I (intermedio) e R (resistente). C₃₀: cloramfenicolo; CIP₅: ciprofloxacina; E₁₅: eritromicina; AM₁₀: ampicillina; TE₃₀: tetraciclina; P₁₀: penicillina; TEC₃₀: teicoplanina; TIL₁₅: tilmicosina; GM₁₂₀: gentamicina; S₃₀₀: streptomina; VA₃₀: vancomicina; SPT₁₀₀: spectinomina. I numeri in pedice si riferiscono alla concentrazione del farmaco nel dischetto.

Numero ceppo	C ₃₀	CIP ₅	E ₁₅	AM ₁₀	TE ₃₀	P ₁₀	RA ₅	TEC ₃₀	TIL ₁₅	GM ₁₂₀	S ₃₀₀	VA ₃₀	SPT ₁₀₀
3	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
4	S	R	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
8	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
15	S	R	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
16	S	R	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
17	S	R	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
18	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
19	S	R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
21	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

8.3.3 CONFRONTO DEI RISULTATI OTTENUTI CON I VALORI RIPORTATI NELLO STUDIO CONDOTTO NEGLI ANNI 2002-2004 (ROSSI *ET AL.*, 2007).

In questo paragrafo vengono confrontati i dati relativi allo studio condotto nello stesso Laboratorio di Batteriologia del DIMEVET nel 2002-2004 da Rossi *et al.* (2007). In quell'occasione era stata campionata una popolazione di cinghiali del Parco dei Gessi Bolognesi e Calanchi dell'Abbadessa composta da 55 soggetti nell'arco di circa due anni (2002-2004), prelevando campioni fecali dall'ampolla rettale e trattandoli per l'isolamento di indicatori fecali come riportato in questa tesi.

Il confronto coi dati riportati nello studio condotto nel 2002-2004 (Rossi *et al.*, 2007) è riportato, in tabella 19 per *Escherichia coli* e tabella 20 per *Enterococcus faecium*. Anche qui, come per il lavoro pubblicato nel 2007, mentre *E. coli* è stato isolato in tutti i soggetti campionati, del genere *Enterococcus* è stata isolata, nel Parco dei Gessi, solo la specie *E. faecium*.

Tabella 19: percentuali di antibioticoresistenza osservate negli isolati di *Escherichia coli* nel Parco dei Gessi Bolognesi nello studio di Rossi *et al.* (2007) e nella presente tesi. Gli aloni compresi nel *range* “intermedi” vengono inclusi in questa tabella come resistenti. (n:numero di isolati su cui sono stati testati i farmaci). I valori assoluti sono riportati in parentesi. AM₁₀: ampicillina; AN₃₀: amikacina; C₃₀: cloramfenicolo; CTX₃₀: cefotaxime; CZ₃₀: cefazolina; CL₁₀: colistina; ENO₅: enrofloxacin; G₂₅: sulfisoxazolo; GM₁₀: gentamicina; K₃₀: kanamicina; NA₃₀: acido nalidixico; S₁₀: streptomina; SXT_{1.25-23.75}: Trimethoprim-sulfamethoxazole; Te₃₀: tetraciclina.

	AmC ₃₀	AM ₁₀	AN ₃₀	C ₃₀	CTX ₃₀	CZ ₃₀	CL ₁₀	ENO ₅	G ₂₅	GM ₁₀	K ₃₀	NA ₃₀	S ₁₀	SPT ₁₀₀	SXT _{1.25-23.75}	TE ₃₀
Rossi <i>et al.</i> (2007) n:55	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)	2 (1)	4 (2)	0 (0)	24 (13)	2 (1)	0 (0)	4 (2)
2012 n:21	0 (0)	5 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	14 (3)	0 (0)	14 (3)	0 (0)	95 (20)	0 (0)	0 (0)	10 (2)

Tabella 20: percentuali di antibioticoresistenza osservate negli isolati di *Enterococcus faecium* nel Parco dei Gessi Bolognesi nello studio di Rossi *et al.* (2007) e nella presente tesi. Gli aloni compresi nel *range* “intermedi” vengono inclusi in questa tabella come resistenti. (n:numero di isolati su cui sono stati testati i farmaci). I valori assoluti sono riportati in parentesi. C₃₀: cloramfenicolo; CIP₅: ciprofloxacina; E₁₅: eritromicina; AM₁₀: ampicillina; Te₃₀: tetraciclina; P₁₀: penicillina; TEC₃₀: teicoplanina; TIL₁₅: tilmicosina; GM₁₂₀: gentamicina; S₃₀₀: streptomina; VA₃₀: vancomicina; SPT₁₀₀: spectinomina.

	C ₃₀	CIP ₅	E ₁₅	AM ₁₀	TE ₃₀	P ₁₀	RA ₅	TEC ₃₀	TIL ₁₅	GM ₁₂₀	S ₃₀₀	VA ₃₀	SPT ₁₀₀
Rossi <i>et al.</i> (2007) n:35	0 (0)	97 (30)	94 (24)	0 (0)	16 (5)	10 (3)	74 (23)	0 (0)	10 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	16 (5)
2012 n:10	0 (0)	100 (10)	60 (6)	0 (0)	20 (2)	0 (0)	60 (6)	0 (0)	10 (1)	0 (0)	10 (1)	0 (0)	10 (1)

antibiotici	Numero ceppi														MIC ₉₀	
	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256		
AM	218															2
GM	3			3	14										0,5	
SXT	6	14													0,06	
AZ	3	14	3												0,12	
CL					6	12	2								1	
EM	1		8	9	2										0,25	
TC	9			9	2										0,25	
CI	19		1												0,12	

8.4 Discussione

Alla luce dei risultati riportati si può asserire che lo spettro di antibioticoresistenza manifestato da indicatori fecali (*E. coli* e *E. faecium*) isolati da cinghiali nel Parco Regionale dei Gessi e Calanchi dell'Abbadessa (BO) non sia sostanzialmente modificato dal primo campionamento eseguito da Rossi *et al.* (2007) negli anni 2002-2004 ad oggi. Nonostante il numero inferiore di soggetti campionati nell'anno 2011, infatti, le caratteristiche dei ceppi di *E. coli* sono sovrapponibili, ad eccezione per un solo caso di resistenza multipla (ID 4) riscontrato, comunque, utilizzando un criterio piuttosto rigido, ovvero accorpando i valori intesi come intermedi ai resistenti.

Premettendo che il numero di enterococchi valutato è piuttosto ridotto, quindi le considerazioni che ne scaturiscono sono da valutare con precauzione, per *Enterococcus faecium*, a differenza dello studio condotto nel 2002-2004, non sono stati riscontrati valori di resistenza di a penicillina, ma è stato isolato un ceppo (ID 19) che ha manifestato resistenze multiple verso 7 molecole diverse (tabella 18). Come per Rossi *et al.* (2007), però, sono state registrate nel complesso scarse resistenze a aminoglicosidi ad alta concentrazione e nulle a ampicillina e vancomicina, molecole comunemente usate in associazione nel trattamento delle infezioni da Enterococchi multiresistenti, mentre sono rimaste pressoché invariate le elevate percentuali di resistenza a rifampicina e eritromicina. L'elevata frequenza con cui si identificano questi resistotipi (riportati anche nel lavoro condotto nel 2002-2004) meriterebbe indagini più approfondite indagando innanzitutto la possibile clonalità dei ceppi isolati e, in secondo luogo, i meccanismi molecolari che possono indurre le resistenze stesse.

In aggiunta, nel nostro caso, le percentuali riguardanti la resistenza alla ciprofloxacina hanno raggiunto il 100% dei ceppi isolati.

Queste differenze, seppur da non sottovalutare, non modificano di molto la valutazione sulla "qualità ambientale" del Parco in esame che, nonostante si trovi in un'area di forte antropizzazione e attraversato da corsi d'acqua che bagnano zone a spinta attività zootecnica, non sembra aver subito significative influenze nei dieci anni trascorsi tra i due studi. Lo stesso animale da cui è stato isolato il ceppo di *E. faecium* multiresistente, infatti, nello studio condotto su germi gram negativi spirillari al capitolo 7, era l'unico di 21 soggetti esaminati da cui è stato isolato *Campylobacter jejuni* a livello intestinale, dimostrando un certo grado di eterogenicità rispetto alla popolazione esaminata.

Anche in questa indagine, come per quella svolta negli anni 2002-2004, infine, si può sottolineare come il monitoraggio dei valori di resistenza agli antibiotici nelle specie selvatiche possa fornire indicazioni di carattere ecologico e sanitario importanti soprattutto per le zone protette, in misura maggiore se l'indagine può essere ripetuta nel tempo in modo da registrare le variazioni che potrebbero scaturire negli anni. Si consideri comunque che il monitoraggio di questi fenomeni in una zona protetta dovrebbe comprendere nel complesso diverse specie animali per

garantire risultati il più realistici possibile. In ogni caso è bene ricordare che sono diverse le aree protette in Italia in cui vengono svolte attività di abbattimento di mammiferi selvatici per il controllo della popolazione e, in questi casi, la possibilità di ottenere il massimo delle informazioni possibili da questi soggetti dovrebbe essere colta come importante risorsa.

Da nessun animale campionato nel Parco dei Gessi Bolognesi e Calanchi dell'Abbadessa, in questa tesi, è stata isolata *Salmonella* spp., mentre nel lavoro condotto da Rossi et al. questo microrganismo era stato isolato in soli 2 dei 55 animali campionati e, una volta tipizzato, aveva trovato corrispondenze in *Salmonelle* ambientali non patogene per l'uomo. Anche questo dato conferma lo stato di "buona salute" del Parco.

Inoltre, in questo lavoro, in aggiunta a quanto svolto da Rossi *et al.*, è stato possibile valutare le caratteristiche di sensibilità e resistenza in isolati di *Campylobacter lanienae* da contenuto ciecale riscontrati nella quasi totalità dei soggetti esaminati (20/21). In questi ceppi non sono state evidenziate resistenze verso nessuna delle molecole testate, sia considerando i *breakpoint* forniti da CLSI e NARMS, sia considerando quelli utilizzati estrapolati da EUCAST (2013), che presentano valori d'interpretazione più severi, in aggiunta tutti i valori di MIC₉₀ sono risultati di almeno due diluizioni inferiori rispetto ai *breakpoint*. I valori di MIC ottenuti per ciascuna molecola, infine, si sono mostrati ampiamente omogenei.

Confrontando i nostri risultati con la poca bibliografia reperibile, si nota come i dati da noi ottenuti si discostano da quanto riportato da Schweitzer *et al.* (2011) che, in uno studio condotto in Ungheria nel 2011 su 23 ceppi isolati da intestino di suini regolarmente macellati, ha riportato percentuali elevate di resistenza alla tetraciclina (60,9% di MIC > 2µg/ml) e isolati resistenti a eritromicina (21%) e ciprofloxacina (5%), così come un ceppo resistente a 5 molecole contemporaneamente (eritromicina, enrofloxacin, acido nalidixico, tetraciclina e clindamicina), mentre tutti i valori di MIC erano sotto il livello di *breakpoint* per ampicillina, gentamicina e cloramfenicolo (Schweitzer *et al.*, 2011).

Analizzando il comportamento dei ceppi di *C. lanienae* da noi indagati, dai soli risultati delle MIC si poteva evincere un certo grado di clonalità della popolazione batterica esaminata ma, confrontando questi dati con i risultati riportati al capitolo 7 dell'analisi genomica con *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) emerge un discreto grado di eterogenicità degli isolati, con 6 su 13 diversi pattern di restrizione se valutata l'omologia al disopra dell'80% e 9/13 se la soglia di omologia viene spostata a 90%.

Le differenze emerse nel comportamento di MIC dei ceppi isolati da Schweitzer *et al.* (2011) e in questa tesi indicano, quindi, che questi microrganismi, come accade per altri batteri, sono in grado di acquisire resistenze soprattutto se si trovano sottoposti a pressioni di selezione, motivo che spiegherebbe perchè i ceppi isolati da suini domestici provenienti da allevamento intensivo (Schweitzer *et al.*, 2011) presentino caratteristiche di resistenza più elevate di quelli da noi isolati in cinghiali

selvatici. Studi ulteriori applicati su isolati da cinghiali provenienti da altre aree più o meno antropizzate potrebbero confermare quanto da noi osservato.

ALLEGATI

PROTOCOLLO N° 1: ESTRAZIONE DNA da PATINA BATTERICA

RIFERIMENTI: *Technical Bulletin* - KIT commerciale SIGMA REExtract-N-Amp™ Tissue PCR kit (SIGMA-Aldrich Inc).

MATERIALI e APPRECCHIATURE

Reagenti:

- KIT commercial SIGMA REExtract-N-Amp™ Tissue PCR kit

Apparecchiature e strumenti:

- Micropipette e puntali con filtro DNA-RNA free
- *Eppendorf* sterili
- Termostato
- Anse monouso sterili da 1 µl

PROTOCOLLO ESTRAZIONE

1. preparazione della soluzione: preparare in *un'eppendorf* sterile 100 µl di Extraction Solution e 25 µl di Tissue Preparation Solution.

2. inoculo del campione: prelevare un'ansata di patina batterica e scaricare il campione dentro la soluzione.

3. estrazione del DNA: incubare a temperatura ambiente per 10 minuti, poi a 95°C in termostato per 3 minuti.

4. arresto della reazione: aggiungere 100 µl di Neutralization Solution B e vortexare.

5. conservazione del DNA: conservare il DNA estratto a -20°C .

PROTOCOLLO N°2: MULTIPLEX PCR SPECIE-SPECIFICA per *ENTEROCOCCUS FAECALIS* e *E. FAECIUM*

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI: Dutka-Malen *et al.*, 1995a e Dutka-Malen *et al.*, 1995b

MATERIALI e APPARECCHIATURE:

Reagenti:

- REExtract-N-Amp PCR reaction mix (SIGMA)
- *Primer E1* [5'-ATCAAGTACAGTTAGTCTT-3']
- *Primer E2* [5'-ACGATTCAAAGCTAACTG-3']
- *Primer F1* [5'- GCAAGGCTTCTTAGAGA-3']
- *Primer F2* [5'- CATCGTGTAAGCTAACTTC-3']
- H₂O deionizzata sterile
- Agar per elettroforesi
- *Sybr Safe DNA gel stain* (INVITROGEN)
- TBE *buffer* 10 %
- DNA molecular weight marker XN (ROCHE)

Estratti DNA dei ceppi batterici usati come controlli:

- Controllo positivo: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Enterococcus faecium* ATCC19494
- Controllo negativo: *Enterococcus casseliflavus* ATCC 25788; *Enterococcus gallinarum* ATCC 35038 e H₂O deionizzata sterile

Apparecchiature e strumenti:

- Micropipette e puntali con filtro DNA-RNA *free*
- *Eppendorf* sterili
- Termociclatore
- Cella orizzontale per elettroforesi

PROTOCOLLO PCR:

1. diluizione dei primers: i *primers* sono utilizzati alla concentrazione di 50 pmol
2. preparazione della mix di reazione: per 1 campione si miscelano, in una *eppendorf* sterile:

- 10 µl REExtract-N-Amp PCR reaction mix
- 1 µl E₁
- 1 µl E₂
- 1 µl F₁
- 1 µl F₂
- 2 µl H₂O deionizzata
- 4 µl di templatolo diluito 1:50

Per un totale di 20 µl di soluzione.

3. protocollo di amplificazione:

- Denaturazione: 94°C x 2 minuti
- 30 cicli composti da
 - Denaturazione: 94°C x 1 minuto
 - Annealing: 54°C x 1 minuto
 - Allungamento: 72°C x 1 minuto
- Estensione finale: 72°C x 10 minuti

ALLESTIMENTO DEL GEL e DELLA CORSA ELETTROFORETICA:

1. preparazione del gel per elettroforesi: in microonde solubilizzare la polvere di agarosio in TBE *buffer* ottenendo una soluzione finale al 1,5% di agarosio. Aggiungere *Syber Safe DNA gel stain* (1%), versare nello stampo e lasciar solidificare.
2. caricamento del gel e corsa elettroforetica: caricare 5 µl di *marker* e 10 µl di amplificato e relativi controlli nei pozzetti ed eseguire la corsa elettroforetica a in TBE *buffer* a 100V per 30 minuti.
3. target:
 - ***Enterococcus faecalis*: 941 bp** del gene che codifica la D-alanina:D-alanina (D-Ala:D-Ala) ligasi
 - ***Enterococcus faecium*: 550 bp** del gene che codifica la D-alanina:D-alanina (D-Ala:D-Ala) ligasi

Conclusioni

La discussione dei risultati ottenuti nei singoli studi descritti in questa tesi è riportata in dettaglio al termine di ogni capitolo del contributo sperimentale. In questa sezione vengono riportate le considerazioni finali scaturite dalle indagini condotte.

- In nessuno dei 38 cinghiali campionati è stato possibile osservare lesioni macro o microscopiche tipiche di infezione da *Lawsonia intracellularis*, dato supportato dall'analisi immunoistochimica risultata negativa in tutte le sezioni di ileo, cieco, colon e linfonodi ileali osservate. Non è stato possibile indagare, quindi, se e in che modo *L. intracellularis* esprima la sua patogenicità nel cinghiale selvatico. Non è nota la prevalenza in Italia di questo patogeno in ambiente selvatico, e gli studi condotti in Centro-Europa e in Svezia riportano risultati contrastanti. Studi ulteriori, quindi, potrebbero essere finalizzati in primo luogo alla valutazione della prevalenza in territorio italiano, per indirizzare un campionamento mirato alla popolazione di cinghiali con prevalenze ipotetiche maggiori per individuare lesioni associate ad infezione da questo microrganismo.
- L'isolamento mirato all'identificazione della flora microbica gastrica dei 21 soggetti indagati ha dato risultati inattesi: non è stato possibile isolare o rilevare il DNA batterico di *H. suis* da mucosa gastrica, ma sono stati isolati, per la prima volta nel cinghiale selvatico, alcuni microrganismi dei generi *Campylobacter* (*C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* e *C. lanienae*) e *Helicobacter* (*H. bilis* e *Helicobacter* Non Ascrivibili a Specie già Descritte – NASD).
- L'indagine batteriologica da contenuto ciecale ha portato all'identificazione di un numero elevato di *C. lanienae*, a discapito di un solo isolato di *C. jejuni* e uno di *C. coli*, normalmente presenti in proporzioni maggiori nel suino domestico. Questo dato, associato ai risultati dello studio genotipico con PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) ha permesso di asserire che *C. lanienae* sia ben adattato alla metapopolazione di cinghiale selvatico da noi osservata, poiché l'elevata eterogenicità genotipica esclude la probabilità che il battere isolato faccia parte di un unico clone trasmesso tra i singoli individui.
- L'isolamento di *Helicobacter* NASD, affini genotipicamente a specie quali *H. mastomyrinus*, *H. marmotae* e *H. typhlonius*, ma diversi dal punto di vista fenotipico, ha permesso di avanzare l'ipotesi che si tratti di una specie non ancora descritta. La filogenesi di questi microrganismi, isolati in grandi quantità nei cinghiali campionati, sarà oggetto di approfondimenti mirati ad ampliare la caratterizzazione fenotipica e genotipica al fine di stabilire se si tratti effettivamente di una specie mai descritta.
- La valutazione di sezioni di mucosa gastrica con diversi sistemi a punteggi ha escluso che la presenza dei microrganismi isolati possa essere correlata a lesioni infiammatorie specifiche, anche se ha condotto al rilevamento di un

numero maggiore di granulociti eosinofili nei soggetti da cui è stata isolata almeno una specie batterica. Questo dato ha consentito di ipotizzare che vi sia un terzo fattore che accomuna le due variabili e che potrebbe risiedere, ad esempio, in una parassitosi non visibile macroscopicamente, che potrebbe giustificare l'elevato numero di eosinofili osservati e l'alterazione dell'ambiente gastrico tale da favorire la crescita microbica.

- L'applicazione di sistemi a punteggio per le lesioni microscopiche osservate in sede intestinale non ha portato a correlazioni specifiche con l'isolamento delle diverse specie batteriche, ma ha dimostrato un incremento del numero di cellule infiammatorie e della loro distribuzione a livello ileale, inoltre ha portato ad una correlazione tra presenza di microrganismi e incremento dello spessore degli strati di lamina propria e tonaca muscolare dell'intestino, altro dato che potrebbe essere correlato ad un terzo fattore, sempre di natura parassitaria, come dimostrato anche da Mansfield *et al.* (2003) nella valutazione tra il grado di sinergia che intercorre fra *C. jejuni* e *Trichuris suis*.
- Il confronto con lo studio condotto negli anni 2002-2004 da Rossi *et al.* (2007) sull'antibioticoresistenza di indicatori fecali (*Escherichia coli* e *Enterococcus faecium*) nei cinghiali del Parco dei Gessi e Calanchi dell'Abbadessa (BO) ha dimostrato ancora una volta il buon "stato di salute" del Parco, in cui i livelli di antibiotico resistenza si sono mantenuti sostanzialmente identici. La comparsa di alcuni isolati multiresistenti, tuttavia, induce a perseverare nel monitoraggio del fenomeno di antibioticoresistenza nel Parco, suggerendo anche di allargare lo spettro di specie animali campionate per avere risultati più esaurienti.
- Sempre in riguardo al fenomeno dell'antibioticoresistenza, i valori omogenei e ridotti di MIC (concentrazione minima inibente) riportati nei ceppi di *C. lanienae* indagati, data la loro eterogenicità genotipica, ha portato alla considerazione che le resistenze manifestate da questo microrganismo in studi condotti in Ungheria nel 2011 (Schweitzer *et al.*, 2011) siano il risultato di acquisizioni secondarie a maggiori pressioni selettive sulla popolazione batterica intercorse negli allevamenti di suini industriali da loro campionati.
- Infine, anche se il cinghiale non è la principale specie animale responsabile di zoonosi, è importante ricordare che per alcuni microrganismi isolati in questo lavoro è stato provato il potenziale zoonosico (*C. jejuni*, *C. coli* e *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*), inoltre di altri non si conosce il ruolo patogeno, ma sono stati identificati in uomini sani (*C. lanienae*) e in soggetti malati (*H. bilis*). Queste considerazioni mettono pongono la questione del rischio sanitario a cui può esser sottoposto il personale addetto alla caccia e alla manipolazione dei visceri e delle carcasse degli animali abbattuti.

Bibliografia

- Abu Al-Soud W, Bennedsen M, On S L W et al.** (2003): "Assessment of PCR-DGGE for the identification of diverse *Helicobacter* species, and application to fecal samples from zoo animals to determine *Helicobacter* prevalence". *Journal of Medical Microbiology*, vol. 52:756-771.
- Alborali L** (2005): "ileite: importanza economica, patogenesi, sintomatologia". Lezione XXIX Corso in Patologia Suina e Tecnica dell'Allevamento. Brescia, 4 ottobre-13 dicembre, 203-214.
- Alter t, Gaull F, Kasimir S et al.** (2005): "Prevalences and transmission routes of *Campylobacter* spp. strains with multiple pig farms". *Veterinary Microbiology*, vol. 108:251-261.
- Baele M, Decostere A, Vandamme P et al.** (2008): "Isolation and characterization of *Helicobacter suis* sp. nov. from pig stomachs". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 58:1350-1358.
- Barone R** (1981): "Intestino del maiale" in "Anatomia Comparata dei mammiferi domestici" vol. 3, 1° ed., Edagricole, Bologna, 405-410.
- Blaser M J, Berkowitz I V, LaForce F M et al.** (1979): "*Campylobacter* enteritis: clinical and epidemiologic features". *Annals of Internal Medicine*, vol. 91:179-185.
- Boerlin P & White D G** (2006): "Antimicrobial Resistance and its Epidemiology" in Giguère S et al., "Antimicrobial therapy in Veterinary Medicine", 4th edition, Blackwell Publishing, Iowa, USA, 27:44.
- Boesen H T, Jensen T K, Jungersen G et al.** (2005): "Development, characterization and diagnostic application of a monoclonal antibody specific for a proteinase K resistant *Lawsonia intracellularis* antigen". *Veterinary Microbiology*, vol. 105(3-4):199-206.
- Bohr U R Primus A, Zagoura A et al.** (2002): "A group-specific PCR assay for the detection of *Helicobacteraceae* in human gut". *Helicobacter*, vol. 7(6):378-383.
- Brosius J, Palmer M I, Kennedy P, Noller H** (1978): "Complete nucleotide sequence of a 16s ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 75(10):4801-4805.
- Butzler J P** (2004): "*Campylobacter*, from obscurity to celebrity". *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 10: 868-876.
- Cannon R M & Roe R T** (1982): "Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians". Bureau of Rural Science, Department of Primary Industry; Australian Government Publishing Service, Canberra, Australia.
- Carnevali L, Pedrotti L, Riga F, Toso S** (2009): "Banca dati ungulati: status, distribuzione, consistenza, gestione e prelievo venatorio delle popolazioni di ungulati in Italia". *Rapporto 2001-2005. Biologia e Conservazione della Fauna*, vol. 117:1-186.
- Casagrande Proietti P, Bietta A, Brachelente C et al.** (2010): "Detection of *Helicobacter* spp. in gastric, fecal and saliva samples from swine affected by gastric ulceration". *Journal of Veterinary Science*, vol. 11(3):221-225.
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute** (2008): "Performance Standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacterial isolated from animals. Approved standards-third edition". CLSI document M31-A3.

- Costa D, Poeta P, Sáenz Y et al.** (2006): "Detection of *Escherichia coli* harbouring estende-spectrum β -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 58(6): 1311-1312.
- Dasti J I, Tareen A M, Lugert R et al.** (2010): "*Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms". *International Journal of Medical Microbiology* vol. 300:205-211.
- De Groote D, Ducatelle R, van Doorn L J et al.** (2000): "Detection of "*Candidatus Helicobacter suis*" in gastric samples of pigs by PCR: comparison with other invasive diagnostic techniques". *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38(3):1131-1135.
- Delogu M, Colombari M, Vasina M, Zengarini M et al.** (2007): "Gestione demografica densità dipendente del cinghiale (*Sus scrofa*) in area protetta: sperimentazione ed esperienze nel Parco dei gessi Bolognesi". Ed. Fondazione cassa di Risparmio di Bologna, Bologna.
- Dewhirst F E, Seymour C, Fraser G J et al.** (1994): "Phylogeny of *Helicobacter* isolates from bird and swine feces and description of *Helicobacter pametensis* sp. nov.". *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol.44(3):553-560.
- Dewhirst F E, Fox J G, On S L W** (2000): "Recommended minimal standards for describing new species of the genus *Helicobacter*". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50:2231-2237.
- Dezorzova-Tomanová K, Smola J, Trcka I et al.** (2006): "Detection of *Lawsonia intracellularis* in wild boar and fallow deer bred in one game enclosure in the Czech Republic". *Journal of Veterinary Medicine* vol. B(53): 42-44.
- Drolet R, Larochelle D, Gebhart C J** (1996): "Proliferative enteritis associated with *Lawsonia intracellularis* (ileal symbiont intracellularis) in white-tailed deer". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, vol. 8:250-253.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P** (1995)a: "Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR". *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 33(1):27-24.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P** (1995)b: ERRATUM "Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR". *Journal of Clinical Microbiology*, vol.33(5):1434.
- EFSA -European Food Safety Authority** (2012): "EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2010". *EFSA Journal* vol. 10(3):2597: 112-132.
- EUCAST-European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing** (2013): "Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters". Version 3.1. <http://www.eucast.org>
- Fabisiak M, Sapiernyński R, Salamaszyńska-Guz A, Kizerwetter-Świda M** (2010): "The first description of gastric *Helicobacter* in free ranging wild boar (*Sus scrofa*) from Poland". *Polish Journal of Veterinary Sciences*, vol. 13(1):171-174.
- Fitzgerald C & Nachamkin I** (2011): "*Campylobacter* and *Arcobacter*" In "Manual of Clinical Microbiology" editors Versalovic J et al., ASM Press, Washington DC, vol. 1:885-899.

- Fox J C, Shen Z, Xu S et al.** (2002a): "*Helicobacter marmotae* sp. nov. isolated from livers of woodchucks and intestine of cats". *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40(7):2513-2519.
- Fox J C, Beck P, Dangler C A et al.** (2002b): "Concurrent helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces *Helicobacter* -induced gastric atrophy. *Nature Medicine*, vol. 6: 536-542.
- Franklin C L, Gorelick P L, Riley L K et al.** (2001): "*Helicobacter typhlonius* sp. nov., a novel murine urease-negative *Helicobacter* species". *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 39(11):3920-3926.
- Frisan T, Guidi R, Guerra L** (2012): "Toxins acting on intracellular targets: only foes or also friends?" in Locht C & Simonet M: "Bacterial Pathogenesis – Molecular and cellular mechanisms" 1st edition, Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Gilliver M, Bennett M, Bergon M et al.** (1999): "*Enterobacteria*: antibiotic resistance found in wild rodents". *Nature*, vol. 410: 233-234.
- Gorkiewicz G, Feierl G, Zechner R, Zechner EL** (2002): "Transmission of *Campylobacter hyointestinalis* from a pig to a human". *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40(7):2601-2605.
- Graves S R, Kennelly-Meritt S A, Tidemann C R et al.** (1988): "Antibiotic-Resistance patterns of enteric bacteria of wild mammals on the Krakatau Islands and West Java, Indonesia". *Philosophical Transactions of The Royal Society of London B*, vol. 322: 339-353.
- Guedes R M C, Gebhart C J, Winkelman L et al.** (2002): "Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy". *The Canadian Journal of Veterinary Research*, vol. 66: 99-107.
- Guedes R M C, Winkelman N L, Gebhart C J** (2003): "Relationship between the severity of porcine proliferative enteropathy and the infectious dose of *Lawsonia intracellularis*". *The Veterinary Record*, vol.153:432-433.
- Haesebrouck F, Pasmans F, Flahou B et al.** (2009): "Gastric *Helicobacters* in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health". *Clinical microbiology reviews*, vol. 22:202-223.
- Hälli O, Ala-Kurikka E, Nokireki T et al.** (2012): "Prevalence of and risk factors associated with viral and bacterial pathogens in farmed European wild boar". *The Veterinary Journal*, vol. 194(1):98-101.
- Hanninen M L, Utriainen M, Happonen I, Dewhirst F E** (2003): "*Helicobacter* sp. flexispira 16s rDNA taxa 1,4 and 5 and finnish porcine *Helicobacter* isolates are member of the species *Helicobacter trogonum* (taxon6)". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 53:425-433.
- Hellemans A, Chiers K, Decostere A et al.** (2007): "Experimental infection of pigs with "*Candidatus Helicobacter suis*". *Veterinary research communications*, vol. 31:385-395.
- Hone J, Pech R, Yip P** (1992): "Estimation of the dynamics and rate of transmission of classical swine fever (hog cholera) in wild pigs". *Epidemiology and Infection*, vol. 108:377-386.
- Inglis G D, Kalischuk L D, Busz H W** (2004): "Chronic shedding of *Campylobacter* species in beef cattle". *Journal of Applied Microbiology*, vol. 97:410-420.
- ISO6579** (2002)(E) "Microbiology – general guidance on methods for the detection of *Salmonella*". *International Organization*

- for Standardization (ISO), 4rded., Geneve, Switzerland.
- Jacobson M, Fellström C, Jensen-Waern M** (2010): "Porcine Proliferative Enteropathy: an important disease with questions remaining to be solved". The Veterinary Journal, vol. 184:264-268.
- Jacobson M, Gerth Löfstedt M, Holmgren N et al.** (2005): "The prevalences of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in swedish piglet producing herds and wild boar population". Journal of Veterinary Medicine. B, infectious diseases and veterinary public health, vol. 52(9):386-391.
- Jay-Russel M T, Bates A, Harden L et al.** (2012): "Isolation of *Campylobacter* from feral swine (*sus scrofa*) on the ranch associated with the 2006 *Escherichia coli* O157:H7 spinach outbreak investigation in California". Zoonoses and Public Health, vol. 59(5):314-319.
- Jensen A N, Dalsgaard A, Baggensen D L, Nielsen E M** (2006): "The occurrence and characterization of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in organic pigs and their outdoor environment". Veterinary Microbiology, vol. 116:96-105.
- Jensen T K, Boesen H T, Vigre H, Boye M** (2010): "Detection of *Lawsonia intracellularis* in formalin-fixed porcine intestinal tissue samples: comparison of immunofluorescence and in-situ hybridization, and evaluation of the effects of controlled autolysis". Journal of Comparative Pathology, vol. 142: 1-8.
- Jensen T K, Vigre H, Sörensen V, Möller K** (2005): "Naturally acquired *Lawsonia intracellularis* infection in pigs studied from weaning to slaughter by indirect immunofluorescence antibody test and polymerase chain reaction on faeces". Research in Veterinary Science, vol. 79:93-98.
- Jinadasa R N, Bloom S E, Weiss R S, Duhamel G E** (2011): "Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages". Microbiology, vol. 157:1851-1875.
- Joens L A** (2004): "*Campylobacter* and *Helicobacter*", in C L Gyles et al.: "Pathogenesis of bacterial Infections in animals" 3th edition, Blackwell Publishing Professional, Iowa, USA.
- Kim C J, Kovacs-Nolan J A, Yang C et al.** (2010): "L-Tryptophan exhibits therapeutic function in a porcine model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis". Journal of Nutritional Biochemistry, vol. 21:468-475.
- Kozak G K, Boerlin P, Janecko N et al.** (2009): "Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada". Applied and Environmental Microbiology, vol. 75(3): 559-566.
- Kusters J G, van Vilet A H M, Kuipers E J** (2006): "Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection". Clinical Microbiology reviews, vol. 19:449-490.
- Ladinig A, Sommerfeld-Stur I, Wiessenböck H** (2009): "Comparative evaluation of diagnostic methods for *Lawsonia intracellularis* infection in pigs, with emphasis on cases lacking characteristic lesions". Journal of Comparative Pathology, vol. 140: 140-148.
- Lawson A J** (2011): "Helicobacter" In "Manual of Clinical Microbiology", editors Versalovic J et al., ASM Press, Washington DC, Vol. 1:900-915.
- Linton D, Owen RJ, Stanley J** (1996): "Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter*

species enteropathogenic for man and animals". Research in Microbiology, vol. 147(9):707-718.

Literak I, Dolejska M, Radimersky T et al. (2010): "Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars". Journal of Applied Microbiology, vol. 108: 1702-1711.

Little C L, Richardson J F, Owen R J et al. (2008): "*Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern". Food Microbiology vol. 25:538-543.

Logan J M J, Burnens A, Linton D et al. (2000): "*Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir". International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 50:865-872.

Man S M (2011): "The clinical importance of emerging *Campylobacter* species". Nature Review/Gastroenterology & Hepatology, vol. 8:669-685.

Mansfield L S, Gauthier D T, Abner S R, et al. (2003): "Enhancement of disease and pathology by synergy of *Trichuris suis* and *Campylobacter jejuni* in the colon of immunologically naïve swine". The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 68(1):70-80.

Massei G & Genov P (2000): "Il Cinghiale". Edizione Edagricole, Bologna.

McOrist S, Gebhart C J, Boid R, et al. (1995): "Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of Porcine Proliferative Enteropathy". International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 45(4):820-825.

McOrist S & Gebhart C J (2012): "Proliferative enteropathy" in Jeffrey J Zimmerman *et al.*, "Disease of swine" 10th edition, Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK, 811-820.

Michaud S, Menard S, Gaudreau C et al. (2001): "Comparison of *Sma*I-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *Kpn*I: a population-based study". Journal of Medical Microbiology, vol. 50:1075-1081.

Mikkonen T P, Kärenlampi R I, Hänninen M L (2004) "Phylogenetic analysis of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species based on partial HSP60 gene sequences". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 54:753-758.

Monaco A, Carnevali L, Toso S (2010): "Linee guida per la gestione del cinghiale (*Sus scrofa*) nelle aree protette". Quaderni di Conservazione della Natura, 2^a edizione, Ministero dell'Ambiente – ISPRA.

Murphy H, Cogan T, Hughes R, Humphrey T (2011): "Porcine intestinal epithelial responses to *Campylobacter* infection". Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease, vol. 34:489-495.

NARMS-National Antimicrobial resistance Monitoring System (2010): "NARMS retail meat annual report, 2010". Disponibile online: www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM293581.pdf

On S L W, Bloch B, Holmes B et al. (1995): "*Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii* subsp. nov., isolated from porcine stomach, and emended description of *Campylobacter hyointestinalis*". International Journal of Systematic Bacteriology, 767-774.

- On S L W & Holmes B** (1991a): "Reproducibility of tolerance tests that are useful in the identification of *Campylobacter*". *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 29:1785-1788.
- On S L W & Holmes B** (1991b): "Effect of inoculum size on the phenotypic characterization of *Campylobacter* species". *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 29:923-926.
- On S L W, Lee A, O'Rourke J L, et al.** (2005): "Genus I. *Helicobacter*" in Garrity G M, et al. editors "Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology", IInd ed., vol. 2 (c), Springer, New York, USA, 1168-1189.
- Oporto B & Hurtado A** (2011): "Emerging thermotolerant *Campylobacter* species in healthy ruminants and swine". *Foodborne Pathogens and Disease* vol. 8(7):807-813.
- O'Rourke J L, Solnick J V, Neilan B A et al.** (2004): "Description of "Candidatus *Helicobacter heilmannii*" based on DNA sequence analysis of 16s rRNA and urease gene". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 54:2203-2211.
- Österblad M, Norrdah K, Korpimäki E et al.** (2001): "Antibiotic resistance: how wild are wild mammals?". *Nature*, vol.409:37-38.
- Park J H, Lee B J, Lee Y S, Park J H** (2000): "Association of tightly spiraled bacterial infection and gastritis in pigs". *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 62:725-729.
- Park J H, Seok S H, Cho S A et al.** (2004): "The high prevalence of *Helicobacter* sp. In porcine pyloric mucosa and its histopathological and molecular characteristics". *Veterinary Microbiology*, vol. 104:219-225).
- Reiner G, Winkelmann M, Willems H** (2011): "Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Germany. *European Journal of Wildlife Research*, vol. 57:443-448.
- Riddle M S, Gutierrez R L, Verdu E F, Porter C K** (2012): "The chronic gastrointestinal consequences associated with *Campylobacter*". *Current Gastroenterology Reports*, vol. 14:395-405.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P et al.** (2011): "MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space". *Systematic Biology* vol. 61: 539-542.
- Rosendaal R, Vos J H, Roumen T et al.** (2000): "Slaughter pigs are commonly infected by closely related but distinct gastric ulcerative lesion-inducing gastrospirilla". *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38(7):2661-2664.
- Rossi M, Delogu M, Ostanello F et al.** (2007): "Antibiotic resistance patterns of fecal indicator organisms and occurrence of *Salmonella* spp. in wild boar (*Sus scrofa scrofa*) in Italy". *International Conference on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens and Antimicrobial Resistance in Pigs and Pork (safe Pork)*, Verona, Italy, 493-495.
- Rossi M, Hänninen M L, Revez J et al.** (2008): "Occurrence and species level diagnostic of *Campylobacter* spp., enteric *Helicobacter* spp. and *Anaerobiospirillum* spp. in healthy and diarrheic dogs and cats". *Veterinary Microbiology*, vol. 129(3-4):304-314.
- Rothkötter H J, Möllof S, Pabst R** (1999): "The influence of age and breeding conditions on the number and proliferation of intraepithelial lymphocytes in pigs". *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 50:31-38.

- Sasaki Y, Fujisawa T, Ogikubo K et al.** (2003): "Characterization of *Campylobacter lanienae* from pig feces". Journal of Veterinary Medical Science, vol. 65(1):129-131.
- Schierack P, Römer A, Jores J, et al.** (2009): "Isolation and characterization of intestinal *Escherichia coli* clones from wild boars in Germany". Applied and Environmental Microbiology, vol. 75(3): 695-702.
- Schley L & Roper T** (2003): "Diet of wild boar *Sus scrofa* in Western Europe, with particular reference to consumption of agricultural crops". Mammal Review, vol. 33(1):43-56.
- Schweitzer N, Damjanova I, Kaszanyitzky E et al.** (2011): "Molecular characterization of *Campylobacter lanienae* from food-producing animals". Foodborne Pathogens and Disease, vol. 8(5):615-621.
- Seo HT, Lee S Y, Uchida T et al** (2011): "The origin of non-*H. pylori* -related positive Giemsa staining in human gastric biopsy specimens: a prospective study". Digestive and Liver Disease, vol. 43: 23-27.
- Shen Z, Xu S, Dewhirst F E et al.** (2005): "A novel enterohepatic *Helicobacter* species "*Helicobacter mastomyrinus*" isolated from the liver and intestine of rodents". Helicobacter, vol. 10(1):59-70.
- Sherley M, Gordon D M, Collignon P J** (2000): "Variations in antibiotic resistance profile in *Enterobacteriaceae* isolated from wild Australian mammals". Environmental Microbiology, vol. 2(6): 620-631.
- Silva J, Leite D, Fernandes M et al.** (2011): "*Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review". Frontiers in Microbiology, vol. 2, Article 200:1-12.
- Sippy R, Sandoval-Green C M J, Sahin O et al.** (2012): "Occurrence and molecular analysis of *Campylobacter* in wildlife on livestock farms". Veterinary Microbiology, vol. 157:369-375.
- Skirrow M B** (1997): "*Campylobacter* enteritis: a new disease. British Medical Journal, vol.2:9-11.
- Smet A, Flahou B, Mukhopadhyaya I et al.** (2011): "The other *helicobacters*". Helicobacter, vol. 16:70-75.
- Smith D G E & Lawson G H K** (2001): "*Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy". Veterinary Microbiology, vol. 82:331-345.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N et al.** (2011): "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods". Molecular Biology and Evolution, vol. 28:2731-2739.
- Taylor D J** (2012): "Miscellaneous bacterial infections", in Jeffrey J Zimmerman et al.: "Disease of swine" 10th edition, Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK, 866-881.
- Tomanová K, Barták P, Smola J** (2002): "Detection of *Lawsonia intracellularis* in wild pigs in the Czech Republic". Veterinary Record, vol. 151:765-767.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994): "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice". Nucleic Acids Research. 22(22):4673-80.

- Ursing J B, Lior H, Owen R J** (1994): "Proposal of minimal standards for describing new species of the family *Campylobacteraceae*". *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 44(4):842-845.
- Vandamme P, Dwhirst F E, Paster B J, On S L W** (2005): "Family I. *Campylobacteraceae*" in Garrity G M *et al.* editors "Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology", IInd ed., vol. 2 (c), Springer, New York, USA, 1145-1168.
- Veermote M, Vandekerckhove T T M, Flahou B *et al.*** (2011): "Genome sequence of *Helicobacter suis* supports its role in gastric pathology". *Veterinary Research*, 42:51.
- Von Altrock A, Hamedy A, Merle R, Waldmann K H** (2012): "*Campylobacter* spp. – prevalence on pig livers and antimicrobial susceptibility". *Preventive Veterinary Medicine*, in stampa (<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.09.010>).
- Wahlström H, Tysén E, Olsson Engvall E *et al.*** (2003): "Survey of *Campylobacter* species, VTEC 0157 and *Salmonella* species in swedish wildlife". *Veterinary Record*, vol. 153:74-79.
- Wacheck S, Fredriksson-Ahomaa M, König M *et al.*** (2010): "Wild boars as an important reservoir for foodborne pathogens". *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 7(3):307-312.
- Yamazaki-Matsune W, Taguchi M, Seto K *et al.*** (2007): "Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*". *Journal of Medical Microbiology*, vol. 56:1467-1473.
- Zelnickova P, Leva L, Stepanova H *et al.*** (2008): "Age-dependent changes in proinflammatory cytokine production by porcine peripheral blood phagocytes". *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 124:367-378.
- Zlotowski P, Mendes Ribeiro Corrêa A, Riegert Borba M *et al.*** (2008): "Enteritis associated with *Lawsonia intracellularis* and *Porcine Circovirus* type 2 infection in wild boars in southern Brazil". *Ciência Rural*, vol. 38(9): 2540-2544.
- Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R, Bagnati R** (2007): "Inquinamento da farmaci: le evidenze (parte I)". *Ricerca & Pratica*, vol. 23(2):67-73.